

Université de Montréal

Évaluation pré-clinique du (-)-[¹⁸F]FEOBV:
Profil métabolique plasmatique.

par
Evelyne Landry St-Pierre

Programme de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Biomédicales

3 décembre, 2008

©, Evelyne Landry St-Pierre, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Évaluation pré-clinique du (-)-[¹⁸F]FEOBV:
Profil métabolique plasmatique.

présenté par :

Evelyne Landry St-Pierre

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Laurent Descarries
président-rapporteur

Jean-Paul Soucy
directeur de recherche

Marc-André Bédard
codirecteur

Naguib Mechawar
membre du jury

Résumé et Mots clés

Introduction. Plusieurs maladies neurodégénératives bénéficieraient de meilleures approches diagnostiques, dont la maladie d'Alzheimer. Celle-ci affecte en particulier les systèmes cholinergiques du SNC, et de nombreuses études d'imagerie ont tenté d'évaluer la dégénérescence de ce système à des fins diagnostiques, à l'aide de ligands radioactifs de diverses composantes du système ACh. En définitive, la plupart de ces études ne se sont pas montrées satisfaisantes. À la recherche de meilleures approches dans ce domaine, nous avons décidé d'évaluer les possibilités offertes par le (-)-[¹⁸F]Fluoroethoxybenzovesamicol ((-)-[¹⁸F]FEOBV), un agent émetteur de positons se liant au VACHT de façon spécifique et réversible. Avant d'en arriver à une utilisation humaine cependant, une validation animale en plusieurs étapes s'avère nécessaire, mais celle-ci nous est apparue justifiée à la lumière de résultats d'études préliminaires en TEP chez le rat, qui se sont montrées très prometteuses. Nous nous sommes donc attaqués à la caractérisation du métabolisme de cet agent. Ceci a exigé, dans un premier temps, la mise au point d'une méthode chromatographique d'analyse des métabolites sanguins et, dans un deuxième temps, l'évaluation de ces métabolites et de leur cinétique chez le rat. Ces données permettront ultérieurement, chez l'humain, de procéder à des études quantitatives en TEP. **Étude #1:** Une fois les paramètres chromatographiques optimisés, le T_R du (-)-FEOBV fut établi à 7.92 ± 0.18 minutes. **Étude #2 :** Le métabolisme *in vivo* s'est montré très rapide et temporellement variable, mais un seul métabolite hydrophile a été identifié. La fonction d'apport au cerveau du (-)-[¹⁸F]FEOBV a pu être établie après correction pour la présence du métabolite détecté. **Conclusion.** Dans l'ensemble, le (-)-[¹⁸F]FEOBV semble très prometteur en tant que marqueur biologique du système cholinergique pré-synaptique.

Mots clés. MALADIE D'ALZHEIMER, TOMOGRAPHIE PAR ÉMISSION DE POSITONS, MÉTABOLISME, TRANSPORTEUR VÉSICULAIRE DE L'ACÉTYLCHOLINE, RAT.

Abstract and Key words

Background. Several neurodegenerative diseases would benefit from better diagnostic tools, and Alzheimer's disease is an obvious point in case. Of interest, that disease particularly affects CNS cholinergic systems. Many studies have evaluated neurodegeneration in that system during the course of Alzheimer's disease, some using imaging techniques with radioactive ligands targeting the cholinergic system. However, most of those studies have shown rather unsatisfying results. Therefore, our team has decided to evaluate a so far never used in primates positron emitting ligand of the VACht which reversibly binds to its target, (-)-[¹⁸F]Fluoroethoxy-benzovesamicol ((-)-[¹⁸F]FEOBV). Of course, before being able to use this ligand in a clinical setting, a multi-step animal validation needs to be performed. As initial experiments with PET imaging yielded encouraging results, assessing the metabolism of (-)-[¹⁸F]FEOBV was the next logical step. First, an HPLC methodology had to be developed to analyse blood metabolites. Then, we were able to use that methodology to analyse metabolites and their kinetics in the rat. That data will allow quantitative studies in humans with PET. **Study #1:** After the chromatographic parameters had been optimised, the T_R of (-)-FEOBV was established at 7.92 ± 0.18 minutes. **Study#2** *In vivo* metabolism was found to be fairly rapid and somewhat temporally variable, but a lone hydrophilic metabolite was identified. The plasmatic input function was obtained and corrected for metabolism. **Conclusion.** Overall, (-)-[¹⁸F]FEOBV holds promise as a potential ACh system pre-synaptic marker.

Keywords. ALZHEIMER'S DISEASE, POSITON EMISSION TOMOGRAPHY, METABOLISM, VESICULAR ACETYLCHOLINE TRANSPORTER, RAT.

Table des matières

Résumé et Mots clés.....	iii
Abstract and Key words	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xi
Dédicace	xiii
Remerciements.....	xiv
1. Introduction	1
1.1. La maladie d'Alzheimer	2
1.1.1. Pathologie de la MA	3
1.1.2. Quelques données sur l'acétylcholine	4
1.2. Quantifier les paramètres cholinergiques.....	6
1.3. [¹⁸ F] Fluoroethoxybenzovesamicol ((-)-[¹⁸ F]FEOBV).....	8
1.4. Étude préliminaire du (-)-[¹⁸ F]FEOBV	10
1.5. Étude du (-)-[¹⁸ F]FEOBV.....	13
2. Méthodes.....	17
Étude #1: Optimiser la méthode d'analyse HPLC du (-)-FEOBV	18
Étude #2 : Établir le profil métabolique et la fonction d'apport au cerveau du (-)- [¹⁸ F]FEOBV chez le rat	21
3. Résultats.....	25
Étude #1: Une méthode d'HPLC pour l'analyse du (-)-FEOBV.....	26

Étude #2 : Profil métabolique et fonction d'apport au cerveau du (-)-[¹⁸F]FEOBV	
chez le rat	30
4. Discussion	38
5. Conclusion	46
6. Bibliographie	48
Annexe A	xiv
Combinaison #1	xv
Combinaison #2	xvi
Combinaison #3	xvii
Combinaison #4	xviii
Combinaison #5	xix
Combinaison #6	xx
Combinaison #7	xxi
Combinaison #8	xxiii
Combinaison #9	xxiv
Combinaison #10	xxv
Combinaison #11	xxvi
Combinaison #12	xxviii
Appendices	xxx
Section A. La tomographie d'émission.	xxxi
Section B. Le métabolisme hépatique	xxxiv
Section C. La chromatographie	xxxvii

Liste des tableaux

Tableau 1. Biodistribution corporelle du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ chez le rat (Mulholland et al., 1998; p.270).....	10
Tableau 2. Estimation des doses de $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ chez l'humain. (Mulholland et al., 1998; p.271).....	11
Tableau 3. Paramètres démographiques des unités biologiques utilisées.....	22
Tableau 4. Résumé des conditions chromatographiques.....	27
Tableau 5. T_R et % ASC du $(-)-\text{FEOBV}$	28
Tableau 6. T_R du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ et de son métabolite, dans le plasma du rat.	30
Tableau 7. Comparaison des %ASC du métabolite et du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$	33

Liste des figures

Figure 1. Schéma du (–)-[¹⁸ F]Fluoroethoxy-benzovésamicol (oxygène : rouge, azote : bleu foncé, Fluor-18 : vert, carbone : bleu ciel)	8
Figure 2. Courbe temps-radioactivité moyenne (n =3) après l'administration de (–)-[¹⁸ F]FEOBV.	14
Figure 3. Modèle simplifié avec référence tissulaire du (–)-[¹⁸ F]FEOBV.	15
Figure 4. Plan sagittal (A), coronal (B) et axial (C) des cartes moyennes de potentiels de liaison (n=3) du (–)-[¹⁸ F]FEOBV, superposées à une IRM de cerveau de rat.....	16
Figure 5. Comparaison des T _R entre deux chromatogrammes.	31
Figure 6. Chromatogramme du détecteur de radioactivité, résultats: 10 minutes post-injection.	32
Figure 7. Chromatogramme du détecteur de radioactivité, résultats: 25 minutes post-injection.	32
Figure 8. Chromatogramme du détecteur de radioactivité, résultats: 70 minutes post-injection.	33
Figure 9. Évolution du profil métabolique en fonction du temps.	34
Figure 10. Distribution de la radioactivité plasmatique totale.	35
Figure 11. Distribution plasmatique du (–)-[¹⁸ F]FEOBV métabolisé.	35
Figure 12. Fonction d'apport au cerveau du (–)-[¹⁸ F]FEOBV corrigée pour les métabolites.	36
Figure 13. Illustration des principes de fonctionnement de la Tomographie par Émission de Positons (TEP).....	xxxii

Liste des sigles et des abréviations

%ID/g	Pourcentage de la dose injectée par gramme
%ID/organe	Pourcentage de la dose injectée par organe
μCi	Microcurie
μg	Microgramme
μL	Microlitre
5-HT	Sérotonine
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholine estérase
ACN	Acétonitrile
ASC	Aire sous la courbe
c.à.d.	C'est-à-dire
ChAT	Choline Acétyl Transférase
É.-T.	Écart-type
FEOBV	Fluoroethoxy-benzovésamicol
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
i.v.	Intraveineuse
MA	Maladie d'Alzheimer
MBq	Méga Becquerels
mCi	Milli-curie
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme

min	Minute
mL	Millilitre
mM	Milli-molaire
mmol	Milli-mole
NA	Noradrénaline
nm	Nanomètre
OSEM	<i>ordered-subset expectation maximization</i>
<i>pB</i>	Potentiels de liaison (<i>binding potentials</i>)
rpm	Rotation par minute
S/D	Sprague-Dawley
SAC	Société Alzheimer du Canada
SEM	Erreur standard à la moyenne (<i>standard error mean</i>)
SNC	Système nerveux central
SPECT	Tomoscintigraphie par émission monophotonique (<i>Single photon emission computed tomography</i>)
TBq	Téra-becquerel
TEP	Tomographie par émission de positons
TLC	Chromatographie sur couche mince (<i>Thin layer chromatography</i>)
T _R	Temps de rétention
VACHT	Transporteur Vésiculaire de l'Acétylcholine (<i>Vesicular acetylcholine transporter</i>)

*Je dédie cet ouvrage à tous ceux
qui m'ont encouragée et épaulée
durant la réalisation de ce mé-
moire*

Remerciements

Je tiens à remercier les Drs Jean-Paul Soucy et Marc-André Bédard pour leur supervision continue et leur soutien pédagogique.

J'éprouve également une reconnaissance toute spéciale envers les Drs Pedro Rosa-Neto et Gassan Massarweh pour leur soutien indéfectible.

Finalement, j'exprime ma gratitude envers l'équipe du cyclotron et envers le Dr Antonio Aliaga pour les bons conseils et le matériel qu'ils ont mis à ma disposition.

1. Introduction

1.1. La maladie d'Alzheimer

Selon la Société Alzheimer du Canada (SAC), la maladie d'Alzheimer (MA) est de nos jours, au sein du large éventail des maladies neurodégénératives qui touchent environ 24 millions de personnes à travers le monde, la cause la plus fréquente de démence. Cette maladie, dont les symptômes comprennent des altérations de la mémoire, du jugement et du raisonnement, des sautes d'humeur, ainsi que des changements de comportement et des capacités de communication, affecte généralement les personnes âgées de 65 ans et plus (pour une revue, voir Giacobini, 2003). Avec le vieillissement croissant de la population, la MA est devenue un grave problème de santé sociale, et elle est une source majeure de détresses physique et affective pour les personnes atteintes et leurs proches.

La SAC considère, comme d'ailleurs la plupart des autres intervenants de ce domaine, qu'il n'existe présentement pas de façon de déterminer cliniquement avec un niveau satisfaisant de certitude si une personne est atteinte de la MA. Dans le cadre d'une évaluation systématique, le diagnostic est suggéré en se basant sur les antécédents médicaux, sur l'état mental de l'individu et sur son examen médical, le tout permettant d'éliminer d'autres causes pouvant expliquer les symptômes. Le diagnostic en est donc un d'exclusion, qui dans la plupart des cas ne sera confirmé qu'à l'examen anatomo-pathologique *post-mortem* du cerveau.

Dans certaines conditions, le médecin peut juger que la personne doit rencontrer d'autres spécialistes du domaine de la santé qui aideront à établir un diagnostic. Selon Mueller *et al.* (2005), la mesure clinique des déficits cognitifs (évaluation neuropsychologique) peut révéler des atteintes suggestives de la MA, et effectivement une évaluation de ce type est

fréquemment suggérée. Mais cette approche présente de sérieuses limitations, notamment dans le cadre de programmes de recherche clinique sur le traitement de la MA : la reproductibilité de ces mesures est limitée, et les études basées sur la mesure des performances sont incapables de distinguer entre les traitements qui ralentissent ou préviennent la mort neuronale et les traitements qui sont purement symptomatiques (c.à.d. qui augmentent les performances cognitives sans influencer le processus neurodégénératif sous-jacent). Il est aussi possible qu'un traitement modifie la progression de la maladie, mais que ses effets sur la performance cognitive n'apparaissent qu'après un certain délai. En conséquence, le traitement peut être faussement considéré inefficace lorsque seuls les résultats de mesures cliniques de performance cognitive effectuées à court terme sont utilisés.

1.1.1. Pathologie de la MA

À l'examen *post-mortem*, les principales caractéristiques de la MA sont une perte neuronale importante prédominant dans diverses régions du cortex cérébral, la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires dans des régions circonscrites du néocortex et de l'hippocampe, affectant principalement les neurones pyramidaux et leurs synapses, et celle de plaques corticales de matériel amyloïdosique particulièrement nombreuses dans ces mêmes régions du cerveau (Davies & Maloney, 1976; Kar *et al.*, 2004).

Plusieurs systèmes chimiquement définis sont atteints dans le cerveau des personnes souffrant de la MA. Ainsi, les systèmes utilisant l'acétylcholine (ACh), la sérotonine (5-HT), la noradrénaline (NA) et la somatostatine montrent tous des anomalies importantes (Kar *et al.*, 2004). Les noyaux sous-corticaux à l'origine de ces systèmes de projection

au cortex sont affectés par le processus dégénératif. La maladie touche ultimement les noyaux du septum médian, les noyaux sérotoninergiques du raphe et le noyau noradrénergique locus coeruleus (Francis, 1999; Kar, 2004), mais les anomalies neuronales les plus précoces surviennent dans le noyau basal de Meynert, fortement peuplé en cellules cholinergiques, et dans le cortex enthorinal. Il est généralement admis que le système cholinergique est l'un des premiers à être affecté dans la MA (pour une revue, voir Akhondzadeh *et al.*, 2006). Puisque le rôle de l'acétylcholine (ACh) dans le fonctionnement de la mémoire à court terme est bien établi, cette atteinte cholinergique peut être d'emblée considérée comme responsable, au moins en partie, des troubles mnésiques que présentent précocement les sujets atteints de la MA (pour une revue, voir Terry & Buccafusco, 2003). Bien que la présence de pertes neuronales cholinergiques franches précoces dans la MA ne soit pas unanimement reconnue (voir Mufson *et al.*, 2007), même ces auteurs reconnaissent que des anomalies significatives de divers systèmes homéostatiques importants pour la survie de ces neurones surviennent tôt dans le développement ultime d'une MA.

1.1.2. Quelques données sur l'acétylcholine

La revue de Picciotto, en 2002, montre que l'ACh est impliquée dans de nombreux aspects important du fonctionnement du système nerveux central (SNC) : survie neuronale, cycles d'éveil et de sommeil, apprentissage, mémoire, etc.

On peut schématiser comme suit le cycle neuronal de l'ACh. L'enzyme choline acétyltransférase (ChAT) assure la synthèse de l'ACh dans les neurones qui le contiennent. Un transporteur vésiculaire spécifique (VACHT) contribue ensuite à son entreposage dans les

vésicules synaptiques des terminaisons (varicosités axonales). Suite à sa libération dans l'espace synaptique, l'ACh rejoint, et se lie à divers, récepteurs post-synaptiques, qui déterminent son action, puis elle est dégradée par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), en extracellulaire. La choline ainsi libérée, grâce à un transporteur membranaire, retourne dans la varicosité, où elle pourra s'intégrer à une nouvelle molécule d'ACh (Kandell *et al.*, 2000).

Dans le cortex et l'hippocampe des personnes atteintes de la MA, l'enzyme immédiatement impliquée dans la synthèse de l'ACh, la ChAT, est retrouvée à des concentrations très nettement diminuées (et cela s'applique d'ailleurs également aux concentrations de l'AChE) (Akhondzadeh *et al.*, 2006). Ceci est particulièrement intéressant quand on réalise que ces mêmes aires cérébrales sont impliquées dans divers processus cognitifs, en particulier mnésiques, qui sont directement touchés initialement dans la MA. D'ailleurs, spécifiquement dans le néocortex, l'activité de la ChAT est positivement corrélée au degré de sévérité clinique de la MA (Kar *et al.*, 2004).

1.2. Quantifier les paramètres cholinergiques

La MA induisant progressivement une perte massive neurones, le meilleur moyen d'évaluer l'efficacité d'un traitement de la MA serait de déterminer directement le nombre et la fonction des neurones dont la survie est modifiée par l'intervention (Mueller *et al.*, 2005). Des approches de neuroimagerie et des mesures de divers biomarqueurs laissent entrevoir des perspectives intéressantes dans ce sens.

Mulholland *et al.* (1998), par exemple, ont suggéré qu'il serait possible d'employer des ligands radioactifs de l'AChE comme marqueurs de « l'activité cholinergique » ou encore de réaliser des études d'imagerie du VChT avec des dérivés radioactifs du vésamicol. La capacité de mesurer le nombre de cellules cholinergiques ou d'autres paramètres décrivant l'état des ces cellules, dans le cerveau humain vivant, pourrait offrir un outil de recherche utile pour évaluer les dommages neuronaux ou pour superviser l'efficacité de futures thérapies neuroprotectrices chez des sujets souffrant entre autres de la MA (Mulholland *et al.*, 1998). En effet, puisque le VChT est un marqueur spécifique des neurones cholinergiques, il constitue une cible intéressante pour visualiser les terminaisons nerveuses de ces cellules (Schäfer *et al.*, 1995; Efanget, 2000). La spécificité du VChT comme marqueur des cellules cholinergique, suggérée au départ lors d'études de liaison du vésamicol, a été confirmée récemment (Rogers *et al.*, 1989; Mulholland *et al.*, 1998).

Le vésamicol est une molécule qui inhibe la recapture de l'ACh dans les vésicules synaptiques, et qui en diminue également la relâche (Salin-Pascual & Jimenez-Anguiano, 1995). La molécule est cependant très toxique et essentiellement inutilisable dans un

contexte clinique (pour une revue voir Rogers *et al.*, 1989). Par contre, un bon nombre d'études (Rogers *et al.*, 1993a,b; Jung *et al.*, 1990, 1996; Kilbourn *et al.*, 1990; Mulholland *et al.*, 1991a,b; Ingvar *et al.*, 1993; Kuhl *et al.*, 1994, 1996) ont souligné que des dérivés appropriés du vésamicol (ex. benzovésamicol) pourraient permettre de cartographier les terminaisons cholinergiques et de jauger ainsi l'intégrité fonctionnelle des neurones cholinergiques chez l'humain (Mulholland *et al.*, 1998).

1.3. [^{18}F] Fluoroethoxybenzovesamicol ((-)-[^{18}F]FEOBV)

C'est en 1993 qu'un analogue du benzovésamicol, l'éthoxybenzovesamicol marqué au fluor-18 [^{18}F], fut synthétisé (Mulholland, 1993).

Les marquages au [^{18}F] présentent d'emblée plusieurs avantages en imagerie TEP, par rapport à ceux réalisés avec du carbone-11 ([^{11}C]). Le [^{18}F] offre une résolution plus élevée pour l'imagerie (trajet en moyenne plus court des positons) et une plus longue demi-vie physique (110 minutes *vs* 20 minutes), qui permet donc, avec une seule synthèse, de produire plusieurs doses injectables, et surtout qui rend possible des études prolongées. De plus, les ligands marqués au [^{18}F] présentent une plus grande activité spécifique que ceux marqués au [^{11}C], ce qui présente un avantage important dans le cas d'agents possiblement toxiques, comme les dérivés du vésamicol.

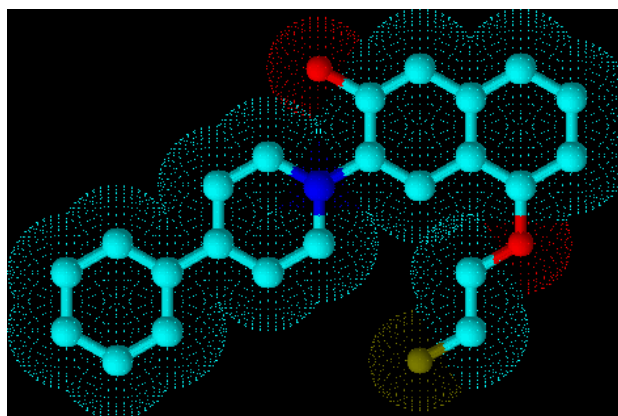


Figure 1. Schéma du (-)-[^{18}F]Fluoroethoxy-benzovésamicol (oxygène : rouge, azote : bleu foncé, Fluor-18 : vert, carbone : bleu ciel)

Les premières études *in vivo* avec cet agent ont été faites chez le rat, dans le but de cartographier la distribution du système ACh dans le cœur. (Degrado *et al.*, 1994; Langer & Halldin, 2001). Ces derniers auteurs ont estimé que la dose typique de [^{18}F]FEOBV né-

cessaire pour l'imagerie chez l'humain représenterait moins d'un millième (1/1000) de la dose estimée toxique, en se basant sur des études effectuées chez la souris.

Nous ne pouvons cependant considérer que la dose de cette molécule devant être administrée à l'humain à des fins d'imagerie est établie de façon claire, ni qu'en dehors de considérations de toxicité, la distribution du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ puisse être visualisée chez l'homme, puisque celle-ci n'a été évaluée, jusqu'à maintenant, que chez le rongeur. En conséquence, malgré quelques données encourageantes, la possibilité d'utiliser le $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ dans un contexte de recherche clinique reste encore à confirmer, et cela exige la réalisation d'une série d'études préliminaires chez l'animal.

1.4. Étude préliminaire du (-)-[¹⁸F]FEOBV

Des quelques études effectuées avec le (-)-[¹⁸F]FEOBV, celle de Mulholland *et al.*, en 1998, demeure le meilleur point de départ. Ces auteurs ont été les premiers à étudier la biodistribution et le métabolisme du (-)-[¹⁸F]FEOBV.

Dans une première étude, ils ont évalué la biodistribution chez le rat, pour tâcher de définir une dosimétrie extrapolable à l'humain. Des doses intraveineuses (i.v.) moyennes de 3.15 ± 1.30 MBq de (-)-[¹⁸F]FEOBV ont été administrées à des rats de 250 ± 35 grammes, sacrifiés 5, 15, 30 ou 120 minutes après l'injection. L'activité de plusieurs tissus et celle de divers fluides corporels ont été mesurées dans un compteur à rayon gamma. Le **Tableau 1** présente ainsi, en pourcentage, la moyenne de la dose de radioactivité injectée par organe (%ID/organe) \pm l'écart-type, tel que mesuré chez quatre rats.

Tableau 1. Biodistribution corporelle du (-)-[¹⁸F]FEOBV chez le rat (Mulholland *et al.*, 1998; p.270)

	5 min	15 min	30 min	120 min
Brain	1.47 \pm 0.11	1.58 \pm 0.20	1.15 \pm 0.12	0.87 \pm 0.13
Eyeballs	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00	0.09 \pm 0.01
Heart	0.77 \pm 0.09	0.64 \pm 0.07	0.46 \pm 0.02	0.30 \pm 0.03
Lung	3.19 \pm 0.45	2.12 \pm 0.47	1.25 \pm 0.10	0.53 \pm 0.14
Liver	11.58 \pm 0.89	6.93 \pm 0.64	6.38 \pm 0.81	2.36 \pm 0.32
Pancreas	1.16 \pm 0.23	2.01 \pm 0.16	1.42 \pm 0.40	0.40 \pm 0.06
Spleen	0.80 \pm 0.18	0.73 \pm 0.11	0.53 \pm 0.06	0.18 \pm 0.04
Adrenal	0.18 \pm 0.06	0.06 \pm 0.05	0.06 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
Kidney	3.39 \pm 0.40	2.25 \pm 0.04	1.53 \pm 0.15	0.76 \pm 0.08
Stomach	1.11 \pm 0.13	1.34 \pm 0.12	1.23 \pm 0.26	0.54 \pm 0.11
Stomach contents	0.28 \pm 0.12	1.60 \pm 1.00	3.43 \pm 2.31	0.93 \pm 0.01
Small intestine	5.36 \pm 1.53	6.50 \pm 1.44	6.72 \pm 2.62	5.81 \pm 1.84
Small intestine contents	1.80 \pm 0.69	1.74 \pm 0.61	2.26 \pm 0.81	42.62 \pm 3.37
Caecum	0.51 \pm 0.10	0.45 \pm 0.08	0.42 \pm 0.10	0.48 \pm 0.05
Caecum contents	0.54 \pm 0.21	0.54 \pm 0.07	1.21 \pm 0.29	2.15 \pm 1.15
Large intestine	0.98 \pm 0.26	0.89 \pm 0.16	0.81 \pm 0.11	0.70 \pm 0.12
Large intestine contents	0.28 \pm 0.09	0.18 \pm 0.10	0.65 \pm 0.29	0.54 \pm 0.24
Ovary	0.28 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
Muscle*	0.32 \pm 0.14	0.30 \pm 0.04	0.27 \pm 0.05	0.18 \pm 0.02
Bone*	0.32 \pm 0.01	0.42 \pm 0.06	0.30 \pm 0.01	0.33 \pm 0.06
Urine	0.07 \pm 0.01	0.23 \pm 0.05	1.05 \pm 0.36	2.72 \pm 0.12
Blood*	0.22 \pm 0.03	0.22 \pm 0.03	0.026 \pm 0.03	0.28 \pm 0.02
Testes	0.71 \pm 0.03	0.75 \pm 0.02	0.98 \pm 0.03	0.82 \pm 0.12
Rest of carcass	68.2 \pm 2.2	67.7 \pm 1.8	68.9 \pm 3.6	37.67 \pm 3.1
Total recovery	101 \pm 2.5	98 \pm 1.9	98.4 \pm 3.0	95 \pm 4.0

Values are the mean percent injected dose per organ \pm SD of at least four animals at each time point, except where noted otherwise.
 *Values expressed as percent injected dose per gram.

Ces résultats indiquent que la radioactivité a été principalement éliminée par voie gastro-intestinale : après 120 minutes, près de 50% de la dose injectée se retrouve dans le petit intestin et son contenu.

En se basant sur le système de dosimétrie MIRD (*Medical Internal Radiation Dosimetry*), les auteurs ont calculé les doses radioactives à divers organes, à partir de la biodistribution chez le rat, et ont extrapolés les résultats à l'humain. Selon ces mesures présentées au **Tableau 2**, la partie supérieure du colon de l'humain recevrait la plus grande dose (organe critique) : 0,67 rad/mCi, ce qui permettrait d'administrer une quantité de (–)-[¹⁸F]FEOBV allant jusqu'à 370 MBq, une dose *a priori* largement suffisante pour des études d'imagerie.

Tableau 2. Estimation des doses de (–)-[¹⁸F]FEOBV chez l'humain. (Mulholland *et al.*, 1998; p.271)

Target organ	Total dose rad/mCi	Rad dose/10 mCi
Brain	0.026	0.26
Lungs	0.04	0.4
Heart	0.05	0.5
Bone marrow	0.064	0.64
Spleen	0.072	0.72
Liver	0.086	0.86
Adrenal	0.09	0.9
Uterus	0.11	1.1
Lower large intestine	0.2	2
Pancreas	0.2	2
Ovaries	0.27	2.7
Testes	0.39	3.9
Small intestine	0.6	6
Upper large intestine	0.67	6.7
Whole body	0.06	0.6

Dans une deuxième étude, Mulholland *et al.* (1998) ont étudié le métabolisme de la molécule chez le rat. Suite à l'injection i.v. à deux rats femelles de (–)-[¹⁸F]FEOBV (222 et

296 MBq), des échantillons sanguins de 0.1-0.3mL ont été prélevés à l'aide d'un cathéter inséré dans la veine cave, 5, 10, 30 et 60 minutes après l'injection. Des extraits de plasma ont été obtenus par précipitation et centrifugation (pour une description complète de la méthodologie, voir Mulholland *et al.* 1998) et analysés par chromatographie sur couche mince (TLC, *Thin Layer Chromatography*). Ceci a montré la présence d'un (ou plusieurs, la technique employée ne permettant une séparation précise) métabolite(s) radioactif(s) du (-)-[¹⁸F]FEOBV apparaissant rapidement dans le sang des rongeurs, très polaire(s), et donc facilement séparé(s) du composé initial en TLC. Le pourcentage de (-)-[¹⁸F]FEOBV non-métabolisé dans le sang des deux rats correspondait à environ 80% de la dose initialement injectée à 5 minutes, ceci passant à 65-70% à 10 minutes et à moins de 10% à 60 minutes. Les résultats obtenus par ces auteurs permettent de conclure que le (-)-[¹⁸F]FEOBV, qui possède une très forte sélectivité pour les VACHT, montre un profil métabolique répondant aux exigences d'analyses cinétiques ne requérant pas de prise de sang artériel en TEP. De plus, aucun effet secondaire significatif n'a été rapporté chez le rongeur dans cet article aux doses utilisées. Le groupe de Mulholland conclut donc que le (-)-[¹⁸F]FEOBV représente un excellent candidat pour l'étude de l'innervation cholinergique dans la MA chez l'homme.

1.5. Étude du (-)-[¹⁸F]FEOBV

Notre groupe a mis en place une méthode de synthèse du (-)-[¹⁸F]FEOBV qui s'est avérée simple et robuste. Ceci nous a permis d'entreprendre un projet de recherche visant à déterminer les possibilités d'utilisation de cette molécule à des fins d'imagerie cérébrale en tomographie par émission de positons (TEP). Par ailleurs, si un autre halogène tel que l'iode-123 pouvait être utilisé pour le radiomarquage (ce qui reste évidemment à être établi), la tomographie par émission monophotonique (SPECT, de l'anglais *Single Photon Emission Computed Tomography*) pourrait être proposée comme alternative à la TEP, en raison de sa plus grande disponibilité. Pour une description plus détaillée de ces deux techniques, voir la **section A** de l'appendice. Le but ultime de nos travaux demeure donc de démontrer que le (-)-[¹⁸F]FEOBV est un agent utilisable chez l'humain, où il pourrait servir à établir le diagnostic précoce de MA et à l'évaluation de divers traitements non encore éprouvés de cette maladie.

Les travaux à la base du projet de recherche présenté dans ce document avaient pour but de caractériser certains paramètres du (-)-[¹⁸F]FEOBV en tant que marqueur *in vivo* des neurones cholinergiques cérébraux du rongeur en TEP. Trois rats Sprague-Dawley (S/D) males (350 ± 10 g) anesthésiés à l'isoflurane 2% ont reçu une dose moyenne de 11.1 MBq de (-)-[¹⁸F]FEOBV à haute activité spécifique (74 TBq/ mmol, ce qui correspond à une masse moyenne de 54 ug de FEOBV par injection). L'enregistrement s'est effectué grâce à un scanner microTEP R4 de CTI/Concorde, en mode liste, pendant 60 minutes. Les images ont ensuite été regroupées en 27 cadres de durées variables croissantes pour être

finaleme nt reconstruites grâ ce à un algorithme de type OSEM. Ces résultats ont fait l'objet de diverses communications (Mzengeza et al, 2007; Pedro-Rosa et al, 2007).

La **Figure 2** représente le %ID/organe pour six régions cérébrales d'intérêt, en fonction du temps. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (SEM). On observe une élimination rapide de la radioactivité du cervelet et cet organe semble rencontrer les critères d'utilisation en tant que référence tissulaire pour la mesure des potentiels de liaison.

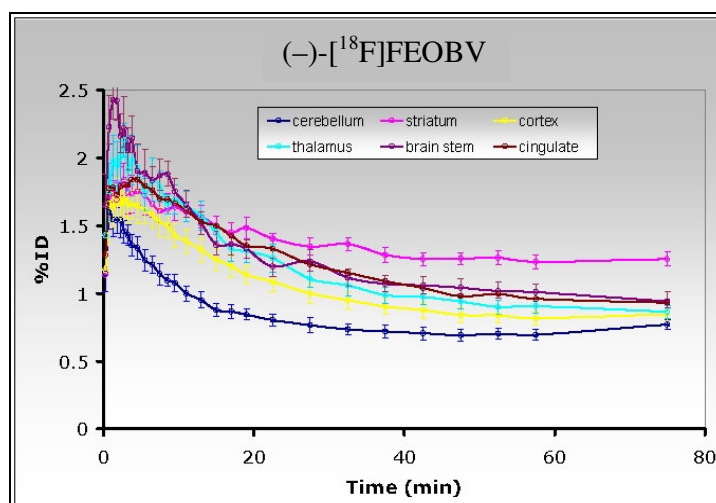


Figure 2. Courbe temps-radioactivité moyenne (n=3) après l'administration de $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$.

Les potentiels de liaison (pB pour “binding potentials”) ont été déterminés grâce à l'analyse du “ modèle simplifié avec référence tissulaire”. Comme nous pouvons le constater dans la **Figure 3**, le striatum, qui possède des cellules cholinergiques résidentes (interneurones) et la plus forte densité d'innervation cholinergique du SNC, montre les plus hauts niveaux de liaison avec le $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$.

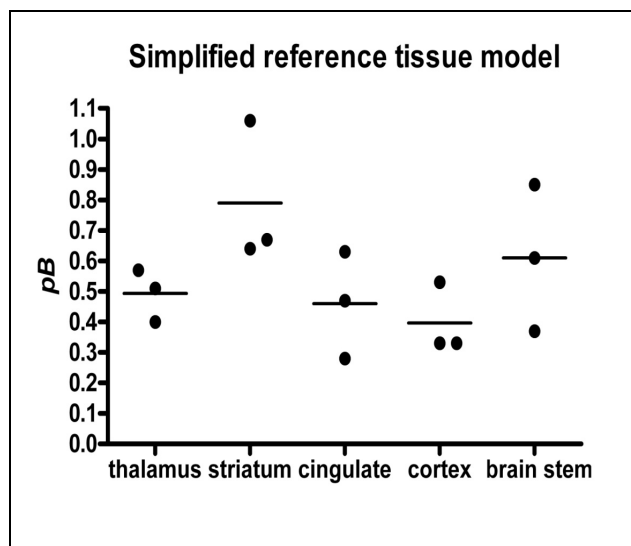


Figure 3. Modèle simplifié avec référence tissulaire du (-)-[^{18}F]FEOBV.

Les images reconstruites ont été recalées et normalisées à une IRM de cerveau de rat pour fins d'analyse. Nous avons alors obtenu la **Figure 4**, qui permet d'affirmer que la distribution observée du traceur *in vivo* est en accord avec les données sur la distribution anatomique des innervations cholinergiques dans le cerveau du rat. Les chiffres représentent le prosencéphale basal et le cortex cingulaire (1), le striatum(2), l'hippocampe / amygdale (3), le cortex (4) et les hémisphères cérébelleux (5).

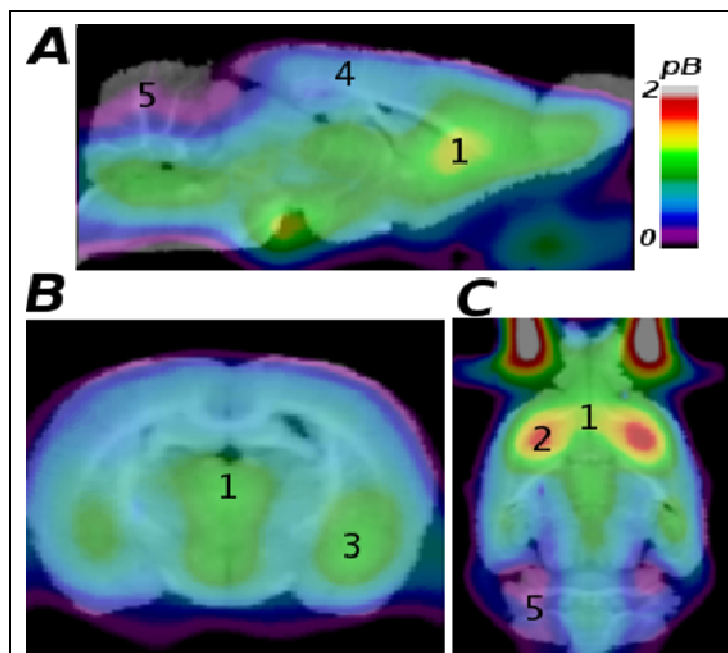


Figure 4. Plan sagittal (A), coronal (B) et axial (C) des cartes moyennes de potentiels de liaison ($n=3$) du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$, superposées à une IRM de cerveau de rat.

Les valeurs de pB les plus élevées ont été retrouvées dans le noyau caudé, dans l'amygdale, l'hippocampe et le prosencéphale basal. Ces résultats confirmaient la possibilité d'utiliser le $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ en TEP pour évaluer les systèmes cholinergiques du SNC.

De là, notre objectif a été de caractériser le métabolisme du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ chez le rat.

Pour ce faire, nous devons premièrement mettre au point une méthode adéquate d'analyse par HPLC, et ensuite établir le profil métabolique et la fonction d'apport au cerveau du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ à partir de son profil métabolique dans le plasma chez le rat. La suite décrit en détail ces travaux.

2. Méthodes

Étude #1: Optimiser la méthode d'analyse HPLC du (–)-FEOBV

Objectif

L'étude #1 avait pour but d'optimiser les conditions d'une méthode mesure du (–)-FEOBV par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Pour n'en faire qu'un bref survol, la chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange. Le mélange à identifier est injecté dans une colonne de chromatographie où il se dilue dans un fluide, appelé phase mobile, qui l'entraîne à travers la colonne, elle-même remplie de divers agents (exemple : résines). Les différentes composantes du mélange injecté sont retenues plus ou moins longtemps dans la colonne en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, qui déterminent leurs interactions avec le contenu de la colonne et la phase mobile. Les constituants du mélange traversent donc la colonne à des vitesses différentes et ils sont ainsi élués (ils sortent) de la colonne à des temps différents, et ils sont donc ainsi séparés (pour une revue complète, voir la **section B** de l'appendice). Comme nous n'avions qu'un seul produit à injecter, l'essentiel était d'identifier le T_R du pic correspondant au (–)-FEOBV de façon fiable.

Les expériences visaient donc à déterminer la concentration des diverses constituants de la phase mobile assurant la meilleure identification du (–)-FEOBV par rapport à ses éventuels métabolites, et à mesurer le T_R exact du (–)-FEOBV et des dits métabolites en fonction de ces conditions chromatographiques.

Système HPLC

Le système HPLC utilisé était composé d'un injecteur, d'une pompe double, d'une colonne chromatographique, d'un détecteur UV et d'un détecteur d'émissions gamma, le

tout assemblé en série. L'injecteur (modèle 7725i, Rheodyne, USA) était serti d'une boucle d'injection de 1 mL. La pompe était un modèle double B2300 (Lab Alliance, PA, USA) et la colonne utilisée était une colonne C18 universelle (4.6 x 250mm), composée de silice et utilisable en phase inversée (voir appendice), de type AtlantisT3 (Waters Limitée, Lachine, QC, Canada). Le détecteur UV était un modèle 525 programmable de Lab Alliance (PA, USA) et le détecteur d'émissions gamma provenait de Bioscan (Washington, DC, USA).

Les constituants de la phase mobile étaient semblables à ceux utilisés par le groupe de Mulholland *et al.* (1998) : acétonitrile (ACN), Na_2HPO_4 et méthanol (MeOH). Les constituants des liquides injectés étaient filtrés (filtres Puradisc 25 mm avec membrane de nylon, 0.45 μm ; Whatman, division Amérique du Nord) juste avant leur entrée dans la colonne. Le volume d'injection a été établi à 50 μL de (–)-FEOBV.

Produits et réactifs chimiques

Le (–)-FEOBV a été acheté chez ABX (Radeberg, Allemagne). L'ACN, le MeOH et le Na_2HPO_4 , tous de qualité HPLC, ont été obtenus de Fisher Scientific (Ontario, Canada).

Le Na_2HPO_4 a été dilué dans de l'eau de qualité HPLC, afin d'obtenir une concentration de 10 mM, ajusté à un pH de 6.7. L'ACN, le Na_2HPO_4 et le MeOH représentent respectivement le premier, le deuxième et le troisième solvant de la phase mobile.

Différentes phases solides et mobiles ont été évaluées lors de la définition des paramètres chromatographiques optimaux, de même que différentes vitesses de déplacement. Les solutions d'injection étaient obtenues en diluant une quantité variable de (–)-FEOBV

dans 100 mL de solvant, composé d'ACN : Na_2HPO_4 : MeOH (65%:25%:15%). Le tout était ensuite injecté dans l'appareillage d'HPLC, en utilisant les proportions de phase mobile, la vitesse de déplacement et la longueur d'onde de détection correspondante.

Analyse des chromatogrammes

Les paramètres chromatographiques de départ ont été choisis en s'inspirant de ceux utilisés par d'autres auteurs (voir Mulholland *et al.*, 1998). Les « meilleures conditions » qui furent retenues pour le reste des analyses ont été celles permettant d'obtenir un pic correspondant à la molécule native avec la plus grande aire sous la courbe (ASC) (pour plus de détails, voir Meyer, 1999). Cette évaluation a également servi à déterminer la reproductibilité de la méthode.

Étude #2 : Établir le profil métabolique et la fonction d'apport au cerveau du (-)-[¹⁸F]FEOBV chez le rat

Objectif

Le composé radioactif (c.à.d. le (-)-[¹⁸F]FEOBV) étant chimiquement identique au composé « froid » (c.à.d. non radioactif) utilisé dans l'étude #1, les conditions optimales d'analyse HPLC définies précédemment ont pu être employées pour l'étude de son profil métabolique *in vivo*. Pratiquement, toujours dans une logique d'utilisation éventuelle en TEP, nous étions en particulier intéressés à définir à quelle vitesse le (-)-[¹⁸F]FEOBV est métabolisé chez le rat, et quels métabolites sont produits (probablement surtout au niveau hépatique; pour des données supplémentaires sur ce sujet, voir la **section B** de l'appendice). En effet, la présence de métabolites lipophiles pourrait compliquer grandement l'utilisation en imagerie du radiotraceur en permettant à ces métabolites, dont la liaison au VChT n'aurait par ailleurs pas été établie, de franchir la barrière hémencéphalique, et imposant l'utilisation de modèles mathématiques d'émulation des données TEP beaucoup plus complexes que ceux pouvant être employés en l'absence de tels métabolites. Ceci pourrait bien entendu avoir des impacts importants sur l'utilisation clinique de l'imagerie TEP de cet agent.

Radioactivité

Le (-)-[¹⁸F]FEOBV a été préparé suivant une procédure standardisée déjà établie dans notre laboratoire (Mzengeza, *et al.*, 2007).

Animaux

Les expériences ont été réalisées en respectant les règles d'éthique du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et du Comité d'éthique pour les expérimentations sur les animaux de l'Institut Neurologique de Montréal.

Six rats mâles de souche Sprague-Dawley (S/D), obtenus de Charles River (Montréal, QC, Canada), ont été utilisés pour établir le profil métabolique ($n= 4$) et la fonction d'apport au cerveau du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ ($n= 2$). Le **Tableau 3** résume les données démographiques des rongeurs utilisés.

Tableau 3. Paramètres démographiques des unités biologiques utilisées.

	<i>n</i>	Poids (grammes)	Activité injectée (MBq)
Profil métabolique	4	$486 \pm 85^{(a)}$	$52 \pm 17^{(a)}$
Fonction d'apport au cerveau	2	$565 \pm 85^{(a)}$	$61 \pm 4^{(a)}$

^(a) moyenne \pm É.T.

Préparation des échantillons plasmatiques : profil métabolique

La centrifugation d'un échantillon sanguin préalablement traité avec un anticoagulant (ex. héparine) permet de séparer les éléments cellulaires (environ 45% de l'échantillon) du plasma.

Tel qu'indiqué au **Tableau 3**, une dose intraveineuse moyenne de 52 ± 17 MBq à haute activité spécifique (74 TBq/mmol, pour une masse injectée de 259 μg) a été administrée à chacun des quatre rats éveillés, par la veine caudale, et les animaux ont été sacrifiés par décapitation, 5, 10, 25 ou 70 minutes après l'injection. Le sang du tronc a été récupéré

dans un tube identifié et pré-traité avec l'héparine, pour être immédiatement centrifugé pendant 10 minutes à 4300 rpm.

Le plasma a ensuite été séparé et placé dans un second tube identifié où 20 μ L d'acide acétique ont été ajoutés pour précipiter les protéines, libérant ainsi le (-)-[18 F]FEOBV lié à ces dernières. Après une nouvelle centrifugation pendant 10 minutes à 4300 rpm, le liquide surnageant a été récupéré et utilisé pour la chromatographie et l'analyse métabolique. Pour chaque temps, cinq échantillons plasmatiques provenant d'un même rat ont été analysés.

Préparation des échantillons plasmatiques : fonction d'apport au cerveau du (-)-[18 F]FEOBV

Les deux rats utilisés pour cette portion de l'étude ont été anesthésiés à l'isoflurane 2%. Nous avons implanté un micro cathéter dans l'artère fémorale permettant le prélèvement des échantillons sanguin à divers temps après l'injection de (-)-[18 F]FEOBV. Pour cela, la peau a été incisée au niveau de l'aîne afin d'exposer l'artère fémorale. Deux ligatures ont permis d'interrompre temporairement le débit sanguin dans un court segment de l'artère, permettant d'y insérer le micro cathéter sans causer de perte sanguine significative. Le micro cathéter, relié à un tube de plastique chirurgical a été solidement cousu à la peau, en trois points, pour en assurer la stabilité. Après avoir vérifié que la plaie ne présentait aucun saignement, la peau de l'aîne a été recousue.

Les animaux, toujours maintenus sous anesthésie, ont été installés sur un chariot adapté et leur température a été maintenue constante à l'aide d'une lampe à infrarouge.

L'électrocardiogramme, le rythme respiratoire et la température ont été enregistrés pendant toute la durée de l'expérimentation.

L'injection intraveineuse de 61 ± 4 MBq à haute activité spécifique (74 TBq/mmol, 305 μ g), dans la veine caudale, a été faite au T_0 de l'expérience. Par la suite, nous prélevé, en utilisant le micro cathéter, 10 échantillons sanguins de 50 μ L, à 30 secondes, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 40, 50 et 60 minutes, et 4 échantillons de 500 μ L, à 5, 10, 25 et 70 minutes, pour un total de 14 échantillons (i.e. 2.5 mL de sang) par rat.

A la fin de l'expérience, les animaux anesthésiés ont été sacrifiés par décapitation. Les échantillons sanguins récupérés dans des tubes pré-identifiés et traités à l'héparine ont été immédiatement centrifugés pendant 10 minutes à 4300 rpm. Le plasma a été prélevé et placé dans un second tube pré-identifié en vue d'une mesure de la radioactivité dans un compteur à scintillation (avec correction pour la décroissance radioactive au temps T_0). Une portion des échantillons correspondants aux temps 5, 10, 25 et 70 minutes a été conservée pour être analysée en HPLC.

Analyse plasmatique par HPLC

Le logiciel d'analyse EZ-start (Lab alliance, PA, USA) a été utilisé aux fins d'analyse des tracés chromatographiques. Les résultats ont été colligés sous forme de chromatogrammes provenant du détecteur UV (détecteur de longueur d'onde pour les composés de masse) et du détecteur gamma (détecteur de radioactivité). Chacun des chromatogrammes était accompagné d'un rapport indiquant le pourcentage d'ASC de chacun des pics. Les chromatogrammes ont été analysés en fonction du T_R , de l'ASC et du pourcentage d'ASC, pour chacun des pics.

3. Résultats

Étude #1: Une méthode d'HPLC pour l'analyse du (–)-FEOBV

De multiples combinaisons de paramètres ($n = 106$) ont été évaluées pour établir la technique optimale de détection du (–)-FEOBV par HPLC. Plusieurs se sont avérées d'emblée inadéquates, et nous ne rapportons ici que les douze jugées les plus performantes.

Le premier élément à définir était la composition de la phase mobile. Pour définir un point de départ, nous nous sommes inspirés de la technique que Mulholland (1998) avait établie. La phase mobile utilisée dans ces travaux consistait en un mélange d'ACN : Na_2HPO_4 : MeOH (60% :20% :20%), pour l'étude du métabolisme cérébral sur des échantillons tissulaires cérébraux provenant de rats et de souris. Comme nous devions par ailleurs effectuer des mesures plasmatiques, avec une colonne et un appareillage de chromatographie différents de ceux utilisés par cet auteur, il a été bien entendu nécessaire de procéder empiriquement à la définition du système idéal. Une méthode en gradient a donc été privilégiée, jusqu'à ce que nous trouvions les proportions optimales des différentes composantes de la phase mobile.

Le second élément devant être défini était la vitesse de déplacement (débit de la pompe). Nous avons utilisé une vitesse de déplacement de base de 1.5 mL/min. La longueur d'onde de détection UV a quant à elle été réglée à 220 nanomètres (nm) dans les premiers tests (voir Mulholland *et al.*, 1998).

Le **Tableau 4** présente les douze combinaisons qui se sont montrées les plus satisfaisantes parmi toutes celles que nous avons testées. Dans ce tableau, la colonne intitulée

« Phase solide » indique le nombre de mg de (-)-FEOBV dilué dans 100mL de solvant, ce dernier étant composé d'ACN : Na₂HPO₄ : MeOH dans des proportions variables, elles mêmes rapportées dans les 3 colonnes de la section « Phase mobile ». Ensuite, pour chacune des combinaisons, la vitesse (mL/min) et la longueur d'onde (nm) utilisées sont rapportées.

Tableau 4. Résumé des conditions chromatographiques.

Combi- naison	Phase solide	Phase mobile			Vitesse	Longueur d'onde
#	mg / 100 mL	ACN (%)	Na₂HPO₄ (%)	MeOH (%)	mL / min	(nm)
1	9.0	70	15	15	1.5	220
2	9.0	60	20	20	1.5	220
3	9.5	50	20	30	1.5	220
4	9.5	40	24	36	1.5	220
5	9.5	30	28	42	1.5	220
6	9.5	70	12	18	1.5	220
7	9.5	70	12	18	1.0	220
8	1.5	70	10	20	1.0	240
9	1.5	65	20	15	1.0	240
10	1.5	65	15	20	1.0	240
11	2.0	65	15	20	0.75	240
12	2.5	65	15	20	0.75	240

Les combinaisons #1 à #5 montrent bien les conséquences d'une diminution progressive de la proportion d'ACN dans la phase mobile qui, de manière générale, se traduisait par

l'obtention d'un T_R plus tardif, comme on peut le voir dans le **Tableau 5** et sur les chromatogrammes en Annexe A (voir combinaisons # 4 et 5).

Tableau 5. T_R et % ASC du (-)-FEOBV.

Combinaison #	T_R (min)	ASC (%)
1	6.54	38.48
2	7.12	42.92
3	$10.34 \pm 0.14^{(a,b)}$	$50.40 \pm 2.48^{(a,b)}$
4	16.48	50.30
5	23.73	50.43
6	9.09	35.95
7	$7.56 \pm 0.25^{(a,c)}$	$45.01 \pm 12.30^{(a,c)}$
8	7.90	59.99
9	6.26	77.17
10	6.30	77.11
11	$7.92 \pm 0.30^{(a,c)}$	$76.08 \pm 2.99^{(a,c)}$
12	$7.92 \pm 0.07^{(a,d)}$	$70.01 \pm 0.67^{(a,d)}$

^(a) Moyenne \pm É.T.

^(b) $n=2$

^(c) $n=3$

^(d) $n=4$

Au contraire, lorsque l'ACN était retrouvée à plus de 50% dans la phase mobile (voir combinaisons # 1, 2, 6 à 12 en Annexe A), le (-)-FEOBV était élué plus facilement, ce qui nous donnait un T_R moins élevé.

Les combinaisons #1 à 6 utilisaient une vitesse de 1.5 mL/min, mais celle-ci a été établie à 1.0 mL/min pour les combinaisons # 7 à 10, parce que le pic de (-)-FEOBV était plus tardif, facilitant ainsi l'identification du composé. Le premier tiers du total des tests a été fait avec une vitesse de 1.5 mL/min (combinaisons #1 à 6), le deuxième tiers à 1.0 mL/min et le dernier tiers à 0.75 mL/min. Le **Tableau 5** montre que la combinaison #10, avec une vitesse de déplacement de 1.0 mL/min, donnait un $T_R = 6.30$ min et que les combinaisons #11 et 12, avec une vitesse de 0.75 mL/min, donnaient respectivement des T_R de 7.92 ± 0.30 min et de 7.92 ± 0.07 min. Comme le pic se présentait plus tardivement avec cette dernière vitesse et qu'il laissait amplement le temps de détecter d'autres composés plus hydrophiles, tous les tests subséquents ont été faits à 0.75 mL/min (voir les combinaisons # 11-12).

Finalement, les premières combinaisons (# 1 à 7) ont utilisé une longueur d'onde de 220 nm, tel que suggéré par Mulholland *et al.* (1998). Cependant, c'est en testant une longueur d'onde de 240 nm que nous avons obtenus les meilleurs résultats (voir combinaisons #8 à 12).

Pour résumer, la phase mobile optimale pour le (-)-FEOBV était composée d'ACN : Na_2HPO_4 : MeOH dans des proportions de 65% :15% :20% (voir les combinaisons # 10 à 12). Dans ces 3 combinaisons, la phase solide était composée de 50 μL de 2.0 ± 0.5 g/100 mL, la vitesse était de 0.75mL/min et la longueur d'onde de détection était de 240 nm. Ceci nous a permis d'établir le T_R moyen du (-)-FEOBV à 7.92 ± 0.18 minutes.

Étude #2 : Profil métabolique et fonction d'apport au cerveau du (-)-[¹⁸F]FEOBV chez le rat

Les manipulations étant réalisées avec les conditions chromatographiques optimales établies lors de l'étude #1, nous avons pu comparer les chromatogrammes provenant du détecteur de radioactivité, à ceux provenant du détecteur UV. Alors que le T_R du (-)-FEOBV était de 7.92 ± 0.18 minutes, le chromatogramme provenant du détecteur de radioactivité affichait deux pics, le premier possédant un T_R de 5.28 ± 0.29 minutes, l'autre, un T_R de 8.75 ± 0.49 minutes (**Tableau 6**). Puisque le deuxième pic représente le (-)-[¹⁸F]FEOBV, le premier pic a été attribué à un métabolite qui était donc plus hydrophile que le composé originel. En effet, la colonne étant en phase inversée, elle retient plus longtemps les composés plus lipophiles. Par conséquent, les premiers composés élués et donc les premiers pics apparaissant sur les chromatogrammes sont ceux qui ont le moins d'affinité pour la colonne lipophile utilisée, donc les plus hydrophiles. Les résultats obtenus lors de l'analyse HPLC des échantillons plasmatique sont illustrés dans les **Figures 5 à 8**.

Tableau 6. T_R du (-)-[¹⁸F]FEOBV et de son métabolite, dans le plasma du rat.

Produit analysé	T_R (min)	k (min)
Metabolite	$5.28 \pm 0.29^{(a)}$	$0.15^{-1(b)}$
(-)-[¹⁸ F]FEOBV	$8.75 \pm 0.49^{(a)}$	-----

^(a) moyenne \pm É-T, $n = 23$

^(b) [95% C.I. = 0.14-0.17]; $r^2 = 0.88$

Le léger décalage entre le T_R des pics de (-)-FEOBV détecté par absorption UV et de (-)-[¹⁸F]FEOBV détecté par gammamétrie pourrait s'expliquer par le temps que met le

composé à se déplacer entre le détecteur UV et le détecteur de radioactivité (**Figure 5**). Par ailleurs, les chromatogrammes ne nous renseignent pas sur l'identité du métabolite obtenu. Cette identification exigerait une analyse en spectrographie de masse.

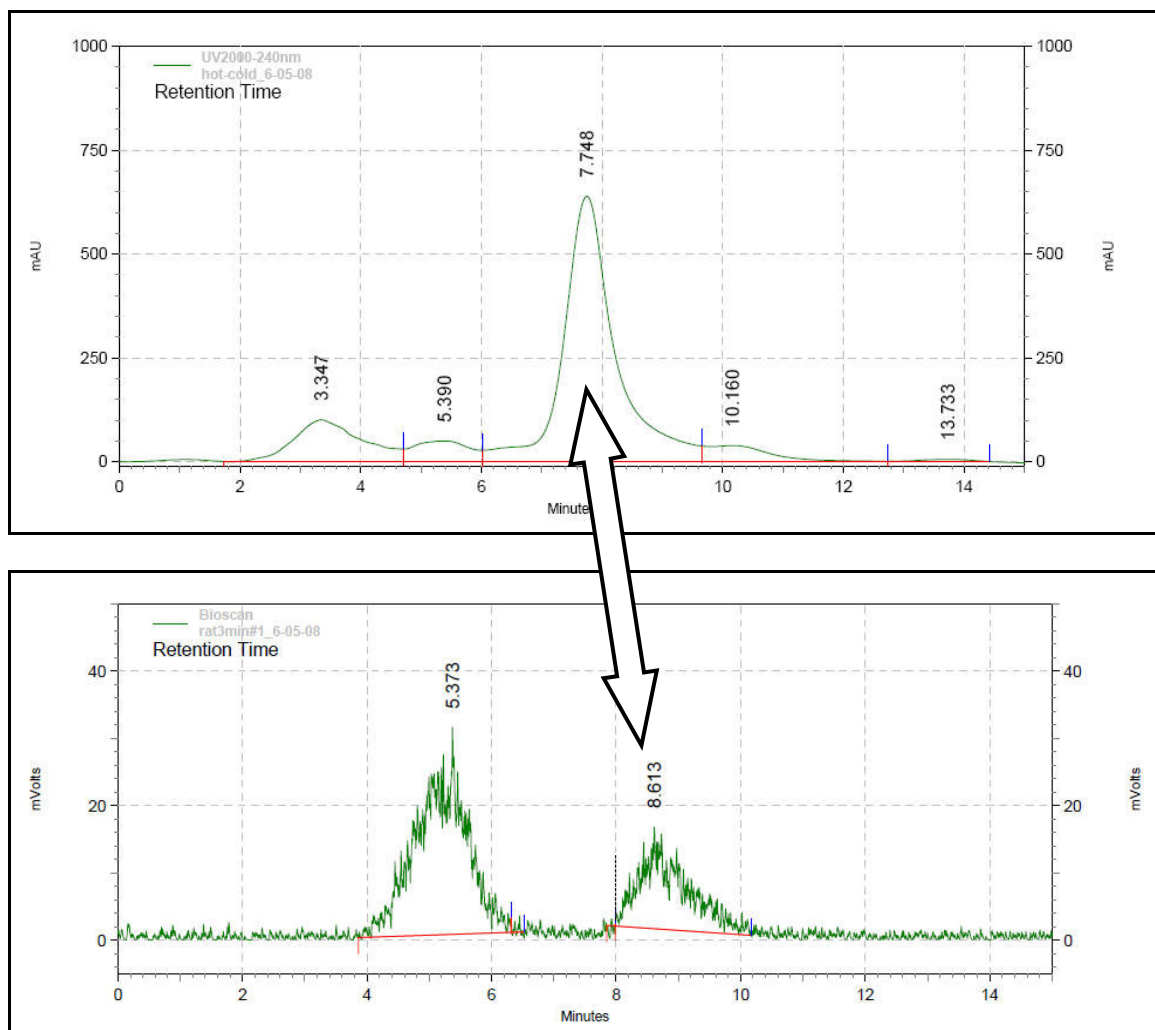


Figure 5. Comparaison des T_R entre deux chromatogrammes.

Il faut aussi mentionner que, des cinq fractions de l'échantillon provenant du rat sacrifié 5 minutes après l'injection du traceur, une seule a présenté deux pics sur le chromatogramme (celui illustré dans la **Figure 5**). Les autres ne montraient qu'un seul pic, celui correspondant au métabolite.

Chez le rat sacrifié 10 minutes suivant l'injection, 3 des 5 fractions de l'échantillon plasmatique ont présenté deux pics sur le chromatogramme, les 2 autres n'affichant qu'un seul pic, celui correspondant au métabolite. La **Figure 6** illustre la fraction #4 pour laquelle deux composés ont été détectés.

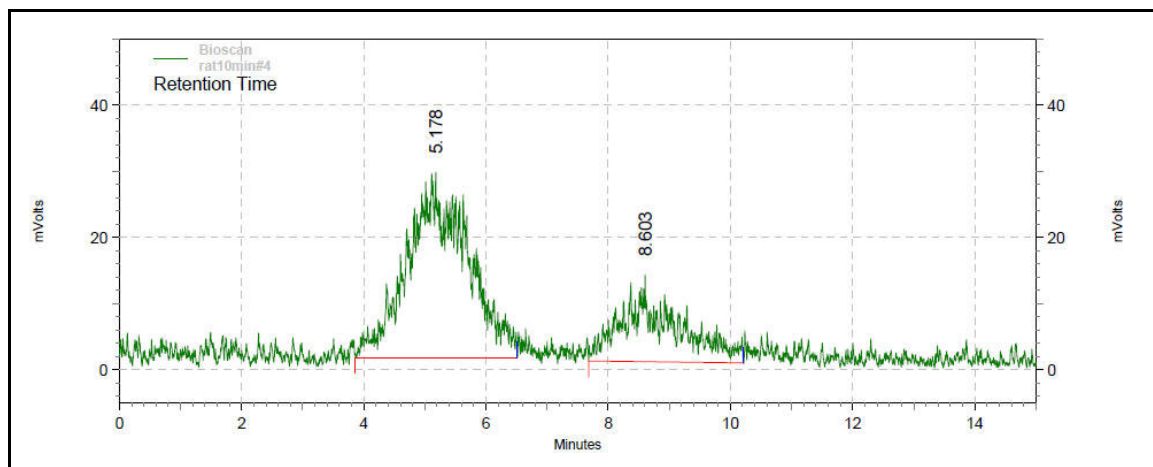


Figure 6. Chromatogramme du détecteur de radioactivité, résultats: 10 minutes post-injection.

Pour le rat sacrifié après 25 minutes, les chromatogrammes des cinq fractions de l'échantillon montrent seulement le pic correspondant au métabolite (**Figure 7**).

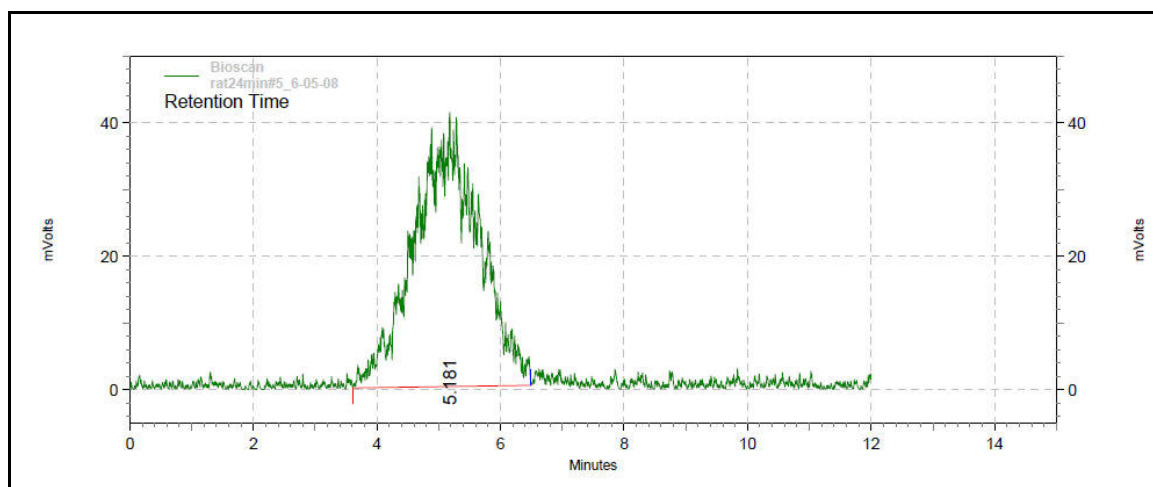


Figure 7. Chromatogramme du détecteur de radioactivité, résultats: 25 minutes post-injection.

Finalement, chez le rat sacrifié à 70 minutes post-injection, les cinq échantillons ne montrent aussi qu'un seul pic correspondant au métabolite (**Figure 8**).

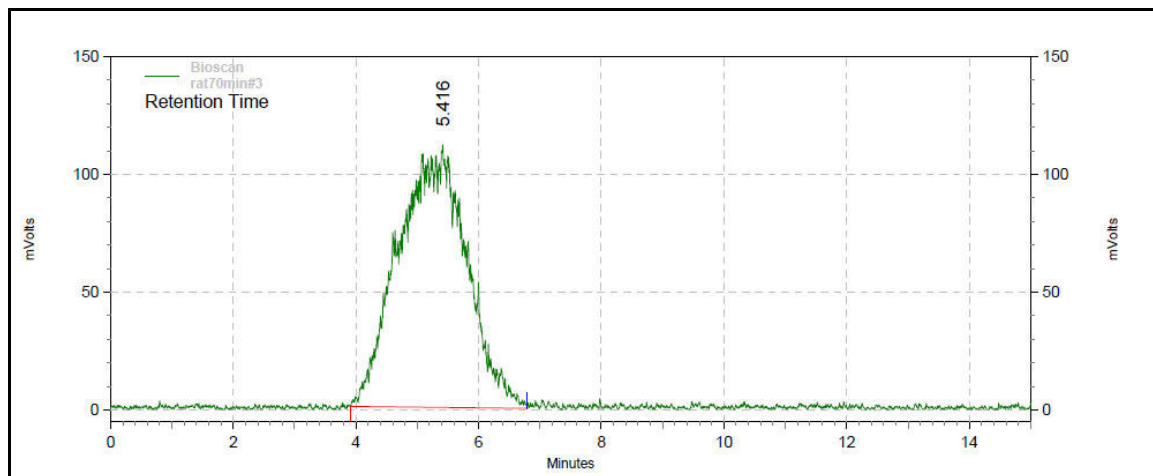


Figure 8. Chromatogramme du détecteur de radioactivité, résultats: 70 minutes post-injection.

Le **Tableau 7** montre les valeurs d'ASC du métabolite et du composé principal aux divers temps examinés. On y constate qu'après 5 minutes, près de 70% du (-)-[¹⁸F]FEOBV a déjà été métabolisé. À 10 minutes, près de 80% de l'activité plasmatique est associée au métabolite alors qu'après 25 minutes (et à 70 minutes), la radioactivité plasmatique est entièrement liée au métabolite.

Tableau 7. Comparaison des %ASC du métabolite et du (-)-[¹⁸F]FEOBV.

Temps (min)	ASC du métabolite (%)	ASC du (-)-[¹⁸ F]FEOBV (%)
5	68.47 ^(a)	31.14 ^(a)
10	76.74 ± 7.19 ^(b)	23.26 ± 7.19 ^(b)
25	100 ^(c)	0 ^(c)
70	100 ^(c)	0 ^(c)

^(a) n= 1

^(b) moyenne ± É.T., n= 3

^(c) n= 5

La **Figure 9**, présente ces mêmes pourcentages sous forme d'un graphique, où chaque point représente la valeur moyenne des analyses plasmatiques. La courbe exponentielle présente une constante $k = 0.15^{-1}$.

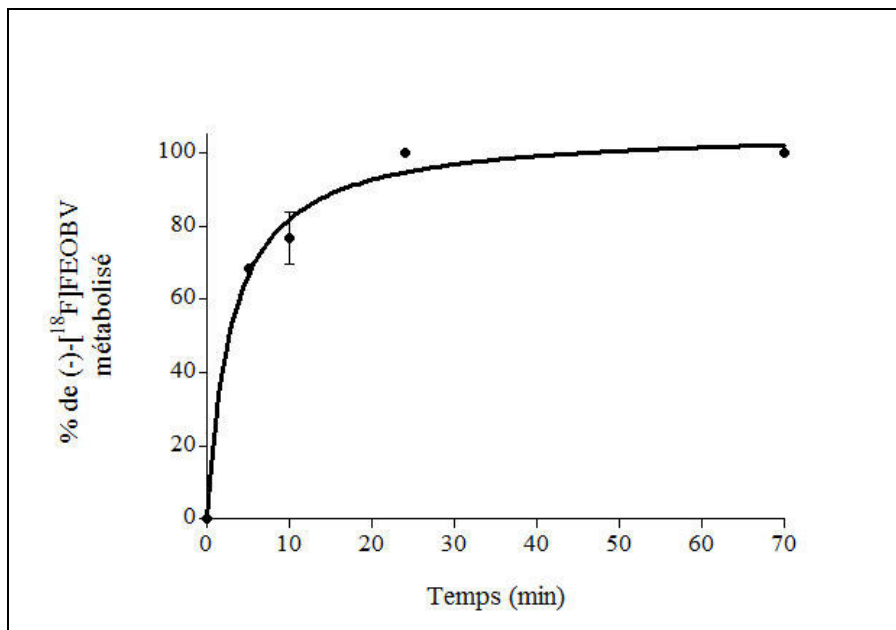


Figure 9. Évolution du profil métabolique en fonction du temps.

Ce graphique permet de déterminer la quantité de métabolite dans le sang, en fonction du temps qui suit l'injection.

Connaissant le profil métabolique de notre produit, nous pouvons établir la fonction d'apport au cerveau du (-)-[¹⁸F]FEOBV. Cette dernière est nécessaire aux calculs qui permettront, lors d'études TEP, d'établir les paramètres standards (pB , entre autres) d'évaluation de la liaison du (-)-[¹⁸F]FEOBV au VACHT. La courbe de la **Figure 10** représente les résultats des comptages de radioactivité plasmatique aux divers temps examinés, la radioactivité étant liée au (-)-[¹⁸F]FEOBV et à son métabolite, et étant exprimée en pourcentage de dose injectée par gramme de plasma.

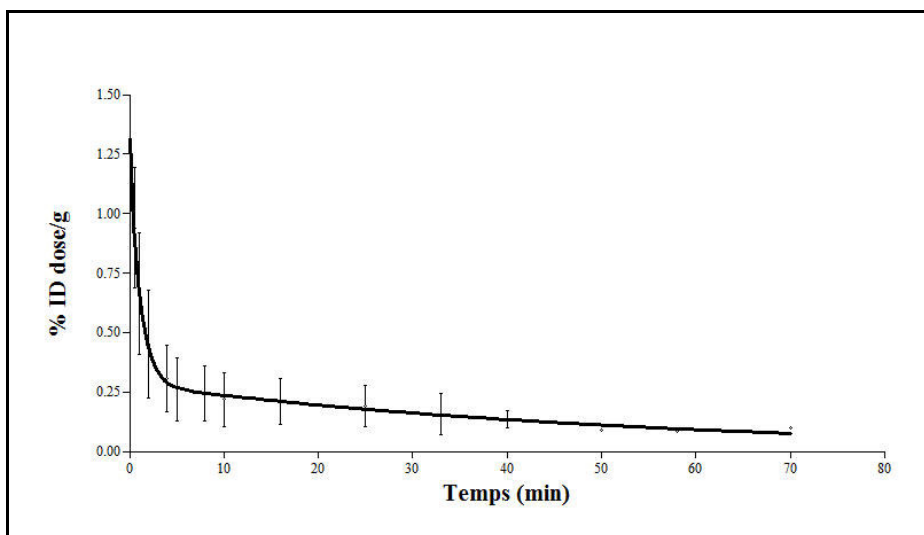


Figure 10. Distribution de la radioactivité plasmatique totale.

La **Figure 11** offre une représentation graphique de la distribution temporelle du (–)- $[^{18}\text{F}]$ FEOBV dans le plasma du rat. Les données sont exprimées en % de la dose injectée par gramme et les barres d’erreurs correspondent à l’écart-type (É.-T.). Le métabolisme est rapide, et il n’y a plus de (–)- $[^{18}\text{F}]$ FEOBV dans le sang 25 minutes après l’injection. Passé ce temps, toute l’activité plasmatique est donc liée au métabolite.

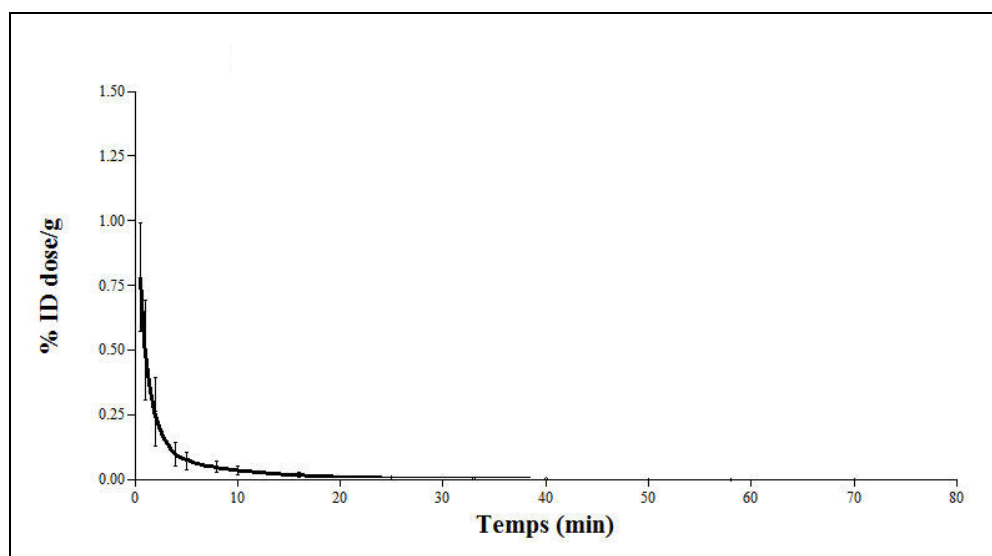


Figure 11. Distribution plasmatique du (–)- $[^{18}\text{F}]$ FEOBV métabolisé.

Finalement, lorsque nous combinons les données sur le pourcentage de métabolisme à celles de la radioactivité plasmatique totale, nous obtenons le taux réel de $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ non métabolisé, présent dans le sang (**Figure 12**), ce qui correspond à la fonction d'apport au cerveau du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ corrigée pour les métabolites.

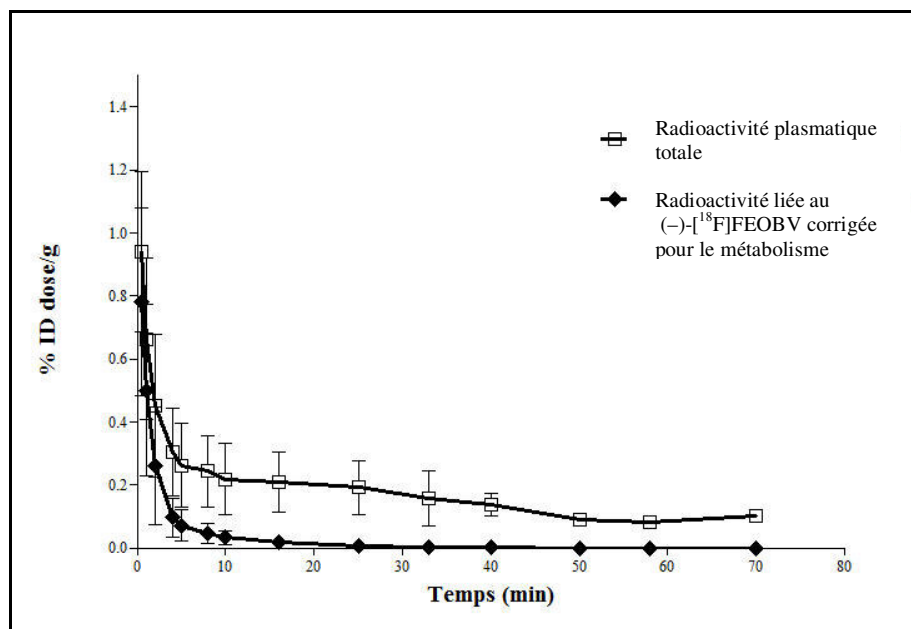


Figure 12. Fonction d'apport au cerveau du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ corrigée pour les métabolites.

Les manipulations réalisées ici n'ont pas été conçues pour évaluer la toxicité du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$. Cependant, divers résultats portant sur ce sujet ont pu être obtenus au cours de nos études. Ainsi, lors de l'étude #2, un de nos rats (d'une masse de 550 grammes) a dû être sacrifié 24 minutes après l'injection, alors qu'il présentait des signes de détresse physiologique identiques à ceux rapportés par Rogers *et al.* (1989) dans une caractérisation biologique du vésamicol et de ses dérivés. Cet animal avait en fait reçu un volume d'injection élevé de traceur à faible activité spécifique (combinaison de deux seringues préparées longtemps auparavant). Nous pouvons donc soupçonner que la quantité massique de $(-)-\text{FEOBV}$ injectée était vraisemblablement très élevée, probablement de l'ordre de 2 à 3 fois supérieure à celle reçue par les autres animaux en raison de

l'horaire des injections après la synthèse de l'agent, ce qui a entraîné les complications décrites plus haut. Par ailleurs, nous avons observé une cyanose chez un des deux rats ayant été utilisé dans la portion de l'étude ayant servi à établir la fonction d'apport au cerveau du (-)-[¹⁸F]FEOBV. Le rat pesait 480g et la radioactivité injectée était de 65.12 MBq, ce qui correspondait probablement, compte tenu du temps d'injection après synthèse, à une dose de 1300 µg, à nouveau supérieure aux doses qui seront employées lors d'études d'imagerie (voir la discussion). En effet, pour pouvoir adéquatement identifier le (-)-[¹⁸F]FEOBV lors des études en HPLC, nous devons travailler avec des activités massiques variant entre 0.037 à 0.074 MBq/g. Lors des autres injections, nous n'avons remarqué aucune anomalie des paramètres physiologiques enregistrés (T°, rythme cardiaque et fréquence respiratoire).

4. Discussion

L'étude #1 a permis la définition et la validation de conditions permettant en HPLC une identification sans ambiguïté du (–)-FEOBV et de ses éventuels métabolites dans le plasma. Cette étape était indispensable à notre projet, car aucune méthode chromatographique par HPLC n'avait à ce jour été établie pour cet agent. Les travaux de Mulholland *et al.* (1998) ont été réalisés dans des conditions totalement différentes des nôtres : ainsi, il n'avait utilisé l'HPLC que pour des préparations provenant de tissu cérébral, alors que nous travaillons avec du plasma, et son évaluation de la formation de métabolites dans le plasma s'était faite en TLC seulement. La méthode que nous avons développée permet d'identifier, sans équivoque, le (–)-FEOBV dans le plasma du rat, et de le distinguer de ce qui s'est avéré être un métabolite unique, polaire. Ceci est bien entendu nécessaire à la définition de la fonction d'apport au cerveau du (–)-[¹⁸F]FEOBV utilisée lors d'études quantitatives de la dynamique de cette molécule en TEP. Il est donc possible de conclure, en ce qui concerne cette première étude, que l'objectif initialement défini a été rencontré.

La deuxième étude nous a permis d'établir, pour la première fois, un profil métabolique plasmatique du (–)-[¹⁸F]FEOBV, chez le rat, en utilisant l'HPLC. Tel que nous le rapportons plus tôt, Mulholland *et al.* (1998) a établi un profil métabolique plasmatique en étudiant avec la TLC des échantillons sanguins prélevés chez deux rats femelles. Les résultats de cet auteur sont très différents de ceux obtenus ici : en effet, le pourcentage de FEOBV non-métabolisé dans le plasma rapporté par lui est d'environ 80% à 5 minutes, de 65-70% à 10 minutes, de 50% à 30 minutes et de moins de 10% à 60 minutes. Nos résultats font état d'une transformation beaucoup plus rapide du (–)-[¹⁸F]FEOBV. Évidemment, les méthodes d'analyse chromatographique utilisées étaient différentes (TLC dans un cas, HPLC dans l'autre), mais il est difficile de savoir si l'importance de la di-

vergence des résultats des deux études, qui est majeure, peut s'expliquer seulement sur la base de différences techniques. De plus, au-delà d'approches chromatographiques dont les résolutions sont différentes, le traitement des échantillons s'est effectué de façons dissemblables dans les deux études : alors que nous avons simplement centrifugé les échantillons sanguins pour ensuite précipiter les protéines plasmatiques par ajout d'acide acétique avant de procéder à l'HPLC, Mulholland (1998) a ajouté une phase de lavage des globules rouges à l'éthanol et combiné le produit de cette préparation au plasma obtenu après centrifugation, puis procédé à une précipitation des protéines à l'acide acétique et à un rééquilibrage du pH (le faisant passer à des valeurs « basiques » non précisées par ajout de NaOH) de l'échantillon avant de procéder à la TLC. Une portion de l'activité présente dans les globules rouges a donc été incluse dans l'analyse de Mulholland (1998), et ceci pourrait évidemment représenter un compartiment avec une cinétique différente de celle du compartiment plasmatique. Cependant, dans le cadre de la caractérisation d'une molécule destinée à des études d'imagerie cérébrale, c'est son comportement dans le compartiment plasmatique, le seul qui puisse avoir des échanges avec le compartiment nerveux, qui présente le plus grand intérêt.

Également, les puissances statistiques de l'étude de Mulholland (1998), et à un moindre degré de la notre, demeurent sous-optimales : les nombres d'animaux évalués par Mulholland ($n = 2$) et par nous ($n = 4$ pour l'étude #1, $n = 2$ pour l'étude #2) sont limités, contribuant à une variabilité possiblement élevée des mesures; à nouveau cependant, la différence entre ses résultats et les nôtres est probablement trop grande pour s'expliquer sur cette seule base.

Finalement, les approches utilisées étaient différentes d'un autre point de vue également: Mulholland (1998) a réalisé ses mesures en prélevant à divers temps après l'injection des échantillons sanguins séquentiels provenant mêmes animaux, alors que nous avons dans l'étude #2 évalué les transformations du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ en sacrifiant des animaux différents à chaque temps, ce qui a permis de travailler sur des échantillons sanguins beaucoup plus volumineux et ainsi de réduire la variabilité technique des résultats chromatographiques, au prix bien entendu d'une augmentation de variabilité liée aux différences interindividuelles de métabolisme. Cependant, lors de la 2^{ème} partie de notre étude #2, les résultats obtenus sur 2 animaux avec une approche identique à celle de Mulholland (1998) se sont avérés tout à fait concordants avec ceux de notre étude réalisée sur des animaux différents.

Au total donc, les causes exactes des discordances entre l'étude de Mulholland (1998) et la nôtre en terme de rapidité de transformation du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ demeurent incertaines, mais le nombre plus élevé d'animaux étudiés par nous, et la convergence de nos résultats, obtenus avec deux approches différentes, nous incitent à conclure que la transformation de cet agent est effectivement rapide dans le compartiment plasmatique.

Il est à noter que des radiotraceurs largement utilisés en TEP humaine ont des comportements similaires : le raclopride marqué au carbone-11, un ligand des récepteurs dopaminergiques de type D2/D3 par exemple, montre 10 minutes après son injection 80% de catabolisme du composé injecté (Forngren *et al.*, 2000), mais cet agent permet malgré tout des études quantitatives sophistiquées de divers phénomènes neurobiologiques, et est un des agents les plus utilisés pour l'étude du système dopaminergique. Il n'y a donc pas

de raison de croire que son métabolisme rapide empêche l'utilisation du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ à des fins d'imagerie en TEP.

Par ailleurs, nous avons observé, tel que décrit plus tôt, une importante variabilité des résultats de mesure des concentrations de la molécule native dans les divers échantillons prélevés : la première des 4 fractions de l'échantillon de 5 minutes chez 1 des 2 rats suivis de façon séquentielle, la première fraction mesurée sur 5 obtenues chez le rat sacrifié à 5 minutes dans le groupe de rats sacrifiés séquentiellement, et les 3 premières fractions mesurées sur 5 obtenues pour le rat sacrifié à 10 minutes dans le même groupe, ont montré la présence de la molécule native. Ceci soulève la possibilité d'une prolongation de la transformation métabolique du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ dans les tubes de prélèvement avant l'inactivation des processus enzymatiques par l'acide acétique. Cette observation laisse entrevoir que lors d'études animales ou humaines au cours desquelles des prélèvements sanguins seront utilisés pour définir la courbe d'entrée cérébral depuis le plasma, il faudra utiliser une technique favorisant une bonne stabilité des concentrations de $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ retrouvé dans l'échantillon.

La mise en évidence d'un seul métabolite relativement hydrophile dans le plasma suite à l'injection du $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ est un des résultats les plus importants de notre étude. En effet, le but des présents travaux étant, encore une fois, de s'assurer de la possibilité d'utiliser cette molécule en imagerie TEP chez l'humain à des fins cliniques (pour le diagnostic précoce de la MA et possiblement d'autres maladies neurodégénératives affectant les systèmes à ACh, ou encore pour l'évaluation des impacts de divers traitements de ces maladies sur la survie des cellules à ACh), il est important d'établir son profil métabolique. Une fois celui-ci connu, il devient possible de juger de la possibilité d'appliquer en

clinique des techniques de modélisation mathématique de la biodistribution du traceur (étape nécessaire à l'évaluation quantitative de ces études TEP) de complexité plus ou moins importante. Quand les métabolites produits s'avèrent plus hydrophiles que le produit natif, ils n'ont en général pas accès au compartiment cérébral (la barrière hémencéphalique bloquant leur diffusion), l'interprétation de l'évolution des concentrations de radioactivité dans le tissu cérébral est beaucoup plus simple, les modèles compartimentaux contenant moins de compartiments différents, et la résolution des équations permettant de mesurer la liaison du traceur à son site « récepteur » peut reposer sur des mesures plus robustes de concentrations radioactives. En fait, pratiquement, les traceurs proposés pour des études TEP qui s'avèrent subir des modifications « in vivo » conduisant à des métabolites lipophiles ne sont que rarement utilisables non seulement en clinique, mais même en recherche, à cause de la complexité des acquisitions TEP requises pour résoudre les équations de liaison. En fait, on peut dire que s'il est important de connaître le profil métabolique d'une molécule destinée à l'imagerie TEP, ce n'est pas surtout pour établir sa vitesse de métabolisme, mais plutôt pour spécifier la nature des métabolites observés, qui est au total plus importante en termes de potentiel d'utilisation.

Avant de conclure, il est difficile de ne pas discuter brièvement de ce que nos études et celles d'autres auteurs permettent de comprendre de la possible toxicité chimique du (-)-FEOBV. En effet, toujours dans une perspective de passage à l'humain, l'utilisation de dérivés d'un agent reconnu hautement toxique, le vésamicol, pourrait être rendue impossible par la présence d'effets toxiques inacceptables. Encore une fois, nos études n'ont d'aucune façon été structurées pour permettre une évaluation rigoureuse de cela, mais il est établi par les résultats de plusieurs études que de faibles doses de vésamicol peuvent bloquer la transmission neuromusculaire, entraînant une paralysie de divers groupes

musculaires, dont respiratoires, qui peut être fatale. Cependant, il existe des différences majeures entre le vésamicol lui-même et ses analogues en termes de profil de toxicité (voir, Rogers *et al.*, 1989). Plus spécifiquement, Mulholland et son équipe (1998) ont évalué, chez la souris, la toxicité du FEOBV non radiomarké. Ils ont étudié la dose mortelle minimale des énantiomères (–) et (+). Des doses intraveineuses de 30 µg/kg se sont avérées mortelles pour la forme (–) du FEOBV, la forme (+) se montrant beaucoup moins toxique (léthalité apparaissant à 4000 µg/kg), ce qui est peu surprenant compte tenu de l’affinité beaucoup plus élevée du VACHT pour la forme (–) (Rogers *et al.*, 1989; De Grado *et al.*, 1994; Mulholland *et al.*, 1998). De façon encourageante, l’étude de Mulholland (1998) n’a par ailleurs révélé aucune évidence de toxicité sub-aiguë. De plus, lors des études initiales d’imagerie réalisées par notre groupe, utilisant des doses traceuses de (–)-[¹⁸F]FEOBV à activité spécifique élevée, nous avons obtenu des examens de haute qualité démontrant bien le potentiel du (–)-[¹⁸F]FEOBV comme traceur de l’innervation cholinergique, sans le moindre signe de toxicité. Au total, il est raisonnable de considérer que le (–)-[¹⁸F]FEOBV est une molécule dont le profil toxicologique reste à établir de façon formelle, mais qui semble pouvoir être utilisée de façon sécuritaire.

En terminant, un article récent de Giboureau *et al.* (2008) soulève un autre obstacle possible à l’utilisation (–)-[¹⁸F]FEOBV. Ces auteurs ont effectué une étude de distribution cérébrale semblable à celle que Mulholland avait faite en 1998. Cependant, alors que ce dernier rapporte des %ID/g de tissus de l’ordre de 8%/g dans le striatum, les valeurs équivalentes rapportées par Giboureau sont de 0.1%/g. En fait, Giboureau (2008) a utilisé le composé racémique (c.à.d. (±)-[¹⁸F]FEOBV), alors que Mulholland (1998) a spécifiquement utilisé le (–)-[¹⁸F]FEOBV. Rappelons-nous que Rogers *et al.* (1989), entre

autres, a montré que le (–)-vésamicol montrait une affinité beaucoup plus grande pour le VACHT que son énantiomère (+), ce qui fut aussi observé dans le cas du (–)-FEOBV par Mulholland en 1998. Il est probable que la faible liaison cérébrale rapportée par Giboureau (2008) soit donc à attribuer à l'utilisation d'une préparation racémique plutôt que (–) pure, qui explique d'ailleurs probablement aussi l'observation par ces auteurs d'une défluorination rapide du traceur chez un seul singe étudié en imagerie.

5. Conclusion

Les résultats présentés ici indiquent que le $(-)-[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ est prometteur comme agent d'imagerie TEP pour l'évaluation *in vivo* de la densité d'innervation cholinergique du système nerveux central, paramètre qui pourrait être important dans l'évaluation de diverses maladies neurodégénératives. Ce ligand des transporteurs vésiculaires du système cholinergique a déjà été montré utilisable chez le rat pour cartographier *in vivo* les systèmes cholinergiques du SNC. Sa haute affinité, liée à la possibilité de radiomarquer le traceur à des niveaux d'activité spécifique élevée, permet d'utiliser des doses minimales de cet agent. Par ailleurs, dans certaines des études présentées ici, le FEOBV s'est avéré toxique. Il faut cependant rappeler que les doses utilisées dans ces études étaient très largement supérieures à celles nécessaires pour réaliser des études TEP *in vivo* de la distribution du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine.

Cet agent est métabolisé très rapidement en un composé hydrophile polaire d'excrétion rapide, et nous n'avons retrouvé aucun métabolite lipophile. De plus, les études d'imagerie ont indiqué une absence apparemment complète de rétention au niveau cérébelleux. Le tout laisse entrevoir la possibilité de générer facilement des résultats quantitatifs décrivant la liaison du radiotraceur à sa cible lors d'études d'imagerie en employant une approche de type « modèle simplifié avec référence tissulaire » (« Simplified Reference Tissue Model »), facile à appliquer dans un environnement de recherche et éventuellement en clinique. Aussi, nos résultats sont encourageants en termes d'utilisation future chez l'humain.

Dans de prochaines études, nous procéderons à une analyse toxicologique plus poussée et à des études plus approfondies visant à améliorer l'activité spécifique du produit final pour optimiser sa dosimétrie et accroître encore sa marge de sécurité diagnostique.

6. Bibliographie

1. Akhondzadeh S. & Abbasi S. H. (2006) Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.*; 21: 113-118.
2. Brunton L., Lazo J. & Parker K. (2005) Chapter 3: Drug metabolism. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw Hill.
3. Davies P. & Maloney A.J.F. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*; 2: 1403.
4. Degradó T.R., Mulholland G.K., Wieland D.M. & Schwaiger M. (1994) Evaluation of (-)-[¹⁸F]Fluoroethoxy-benzovesamicol as a new PET tracer of cholinergic neurons of the heart. *Nucl. Med. Biol.*; 21: 189-195.
5. Efange S.M.N. (2000) *In vivo* imaging of the vesicular acetylcholine transporter and the vesicular monoamine transporter. *FASEB Journal*; 14: 2401-2413.
6. Forngren B. H., Tyrefors N., Markides K.E. & Langstrom B. (2000) Determination of raclopride in human plasma by on-column focusing packed capillary liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromat. B: Biomed. Sci. App.*; 748: 189-195.
7. Francis P.T., Palmer A.M., Snape M. & Wilcock G.K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*; 66: 137-147.
8. Giacobini E. (2003) Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*; 18: S1-S5.
9. Ingvar M., Stone-Elander S., Rogers G.A., *et al.* (1993) Striatal acetylcholine interactions: PET studies of the vesamicol receptor. *NeuroReport*; 4: 1311-1314.
10. Jung Y.W., Van Dort M.E., Gildersleeve D.L. & Wieland D.M. (1990) A radiotracer for mapping cholinergic neurons of the brain. *J. Med. Chem.*; 33: 2065-2068.

11. Jung Y.W., Frey K.A., Mulholland G.K., Del Rosario R., Sherman P.S., Raffel D.M., Van Dort M.E., Kuhl D.E., Gildersleeve D.L. & Wieland D.M. (1996) Vesamicol receptor mapping of brain cholinergic neurons with radioiodine-labeled positional isomers of benzovesamicol. *J. Med. Chem.*; 39: 3331-3342.
12. Kandel E.R., Schwartz J.H. & Jessell T.M. (2000) Principles of Neural Science, 4th edition. McGraw-Hill, Health Professions Division, pp 280-282.
13. Kar S., Slowikowski S.P.M., Westaway D. & Mount H.T.J. (2004) Interactions between β -amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neurosci.*; 29: 427-41.
14. Kilbourn M.R., Jung Y.W., Haka M.S., Gildersleeve D.L., Kuhl D.E. & Wieland D.M. (1990) Mouse brain distribution of a carbon-11 labeled vesamicol derivative: presynaptic marker of cholinergic neurons. *Life Sciences*; 47: 1955-1963.
15. Kuhl D.E., Koeppe R.A., Fessler J.A.A., Minoshima S., Ackerman R.J., Carey J.E., Gildersleeve D.L., Frey K.A. & Wieland D.M. (1994) *In vivo* mapping of cholinergic neurons in the human brain using SPECT and IBVM. *J. Nucl. Med.*; 35: 405-410.
16. Kuhl D.E., Minoshima S., Fessler J.A., Frey K.A., Foster N.L., Ficaro E.P., Wieland D.M. & Koeppe R.A. (1996) *In vivo* mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *J. Ann. Neurol.*; 40: 399-410.
17. Langer O. & Halldin C. (2001) PET and SPECT tracers for mapping the cardiac nervous system. *Eur. J. Nucl. Med.*; 29: 416-434.
18. Meyer J.S. & Quenzer L.F. (2005) Chapter 1: Principles of pharmacology. In: *Psychopharmacology : drugs, the brain, and behavior*. Sinauer Associates.
19. Meyer V.R. (1999) Practical High Performance Liquid Chromatography, 3rd edition. John Wiley & Sons.

20. Mueller S.G., Weiner M.W., Thal L.J., Petersen R.C., Jack C., Jagust W., Trojanowski J.Q., Toga A.W. & Beckett L. (2005) The Alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Neuroimag. Clin. N. Am.*; 15: 869-877.
21. Mufson E.J., Counts S.E., Fahnstock M. & Ginsberg S.D. (2007) Cholinergic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly. *Curr. Alz. Res.*; 4: 340-50.
22. Mulholland G.K., Buck F., Sherman P.S., *et al.* (1991a) 4-[¹⁸F]-fluorobenzyl-ABV: a new potential marker for central cholinergic presynaptic sites. *J. Nucl. Med.*; 32: 994.
23. Mulholland G.K., Sherman P.S., Pisani T.L., *et al.* (1991b) Effect of lipophilicity on brain uptake of labeled aminobenzovesamicols: potential tracers for cholinergic neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*; 11: S622.
24. Mulholland G.K., Jung Y.W., Wieland D.M., Kilbourn M.R. & Kuhl D.E. (1993) Synthesis of [¹⁸F]Fluoroethoxy-benzovesamicol, a radiotracer for cholinergic neurons. *J. Lab. Comp. Radiopharm.*; 33: 583-591.
25. Mulholland G.K., Wieland D.M., Kilbourn M.R., Frey K.A., Sherman P.S., Carey J.E. & Kuhl D.E. (1998) [¹⁸F]Fluoroethoxy-benzovesamicol, a PET radiotracer for the vesicular acetylcholine transporter and cholinergic synapses. *Synapse*; 30: 263-274.
26. Mzengeza S., Massarweh G., Rosa P., Soucy J.P. & Bédard M.A. (2007) Radiosynthesis of [¹⁸F]FEOBV and in vivo PET imaging of acetylcholine vesicular transporter in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*; 27: 10-7U.
27. Picciotto M.R., Alreja M. & Jentsch J.D. (2002) Chapter 1: Acetylcholine. In: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Edited by K.L. Davis, D.

- Charney, J.T. Coyle and C. Nemeroff. American College of Neuropsychopharmacology, pp 3-14.
28. Rogers G.A., Parsons S.M., Anderson D.C., Nilson L.M., Bahr B.A., Kornreich W.D., Kaufman R., Jacobs R.S. & Kirtman B. (1989) Synthesis, *in vitro* acetylcholine storage, blocking activities and biological properties of derivatives and analogues of trans-2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol. *J. Med. Chem.*; 32: 1217-1230.
 29. Rogers G.A., Kornreich W.D., Hand K. & Parsons S.M. (1993a) Kinetic and E equilibrium characterization of vesamicol receptor ligand complexes with picomolar dissociation constants. *Mol. Pharmacol.*; 44: 663-641.
 30. Rogers G.A., Stone-Elander S., Ingvar M., Eriksson L., Parsons S.M. & Widen L. (1993b) F¹⁸-Labelled vesamicol derivatives: synthesis and preliminary *in vivo* small animal positron emission tomography. *Nucl. Med. Biol.*; 21: 219-230.
 31. Rosa-Neto P., Alliaga A., Mzengeza S., Massarweh G., Landry E., Bédard M.A. & Soucy J.P. (2007) Imaging vesicular acetylcholine transporter in rodents using [¹⁸F]Fluoroethoxy-benzovesamicol and micro-PET. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*; 27: 3-7M.
 32. Salin-Pascual R.Z. & Jimenez-Anguiano A. (1995) Vesamicol, an acetylcholine uptake blocker in presynaptic vesicles, suppresses rapid eye movement (REM) sleep in the rat. *Psychopharm.*; 121: 485-487.
 33. Schäfer M.K.H., Weihe E., Erickson J.D. & Eiden L.E. (1995) Human and monkey cholinergic neurons visualized in paraffin-embedded tissues by immunoreactivity for VACHT, the vesicular acetylcholine transporter. *J. Mol. Neurosci.*; 6: 225-235.
 34. Société Alzheimer du Canada. Site consulté en janvier 2008 : <http://www.alzheimer.ca/french/disease/stats-people.htm>

35. Société Alzheimer du Canada. Site consulté en janvier 2008 :
<http://www.alzheimer.ca/french/disease/whatisit-intro.htm>
36. Société Alzheimer du Canada. Site consulté en janvier 2008 :
<http://www.alzheimer.ca/french/disease/diagnosis.htm>
37. Terry A.V. & Buccafusco J.J. (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J. Pharm. Exper. Therap.*; 306: 821-827.
38. Wernick M.N. & Aarsvold J.N. (2004) Chapter 2: Introduction to Emission Tomography. In: *Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT*. Elsevier Academic Press.
39. Zeng G.L., Galt J.R., Wernick M.N., Mintzer R.A. & Aarsvold J.N. (2004) Chapter 7: Single-Photon Emission Computed Tomography. In: *Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT*. Elsevier Academic Press.

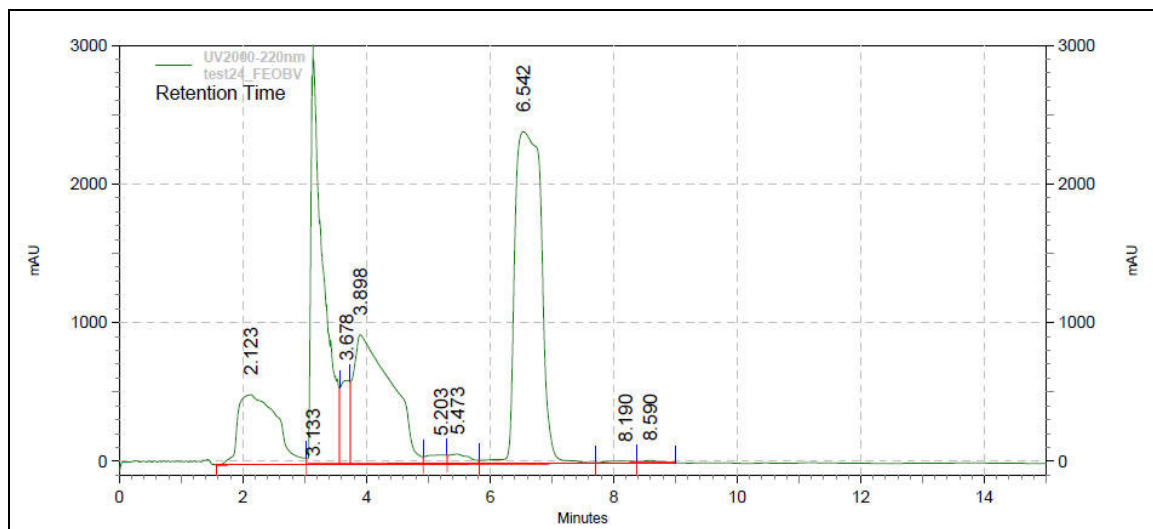
Annexe A

Combinaison #1

9mg/100mL, ACN :Na₂HPO₄ :MeOH (70 :15 :15), vitesse 1.5mL/min, 220nm.

T_R = 6.54

ASC = 38.48 %

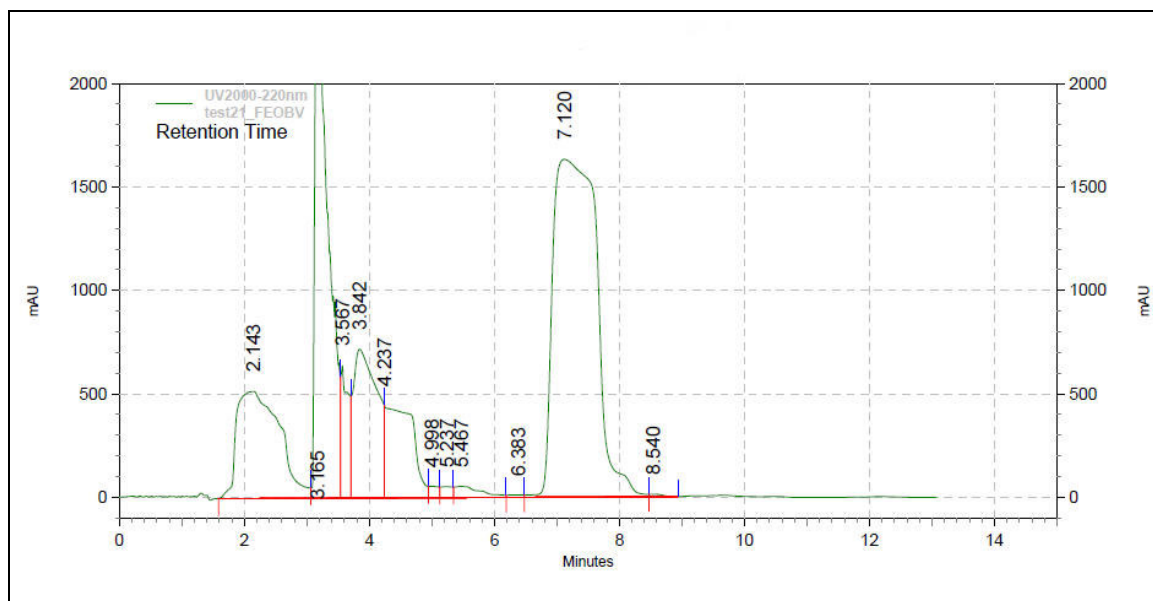


Combinaison #2

9mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (60 :20 :20), vitesse 1.5mL/min, 220nm.

T_R =7.12

ASC = 42.92%



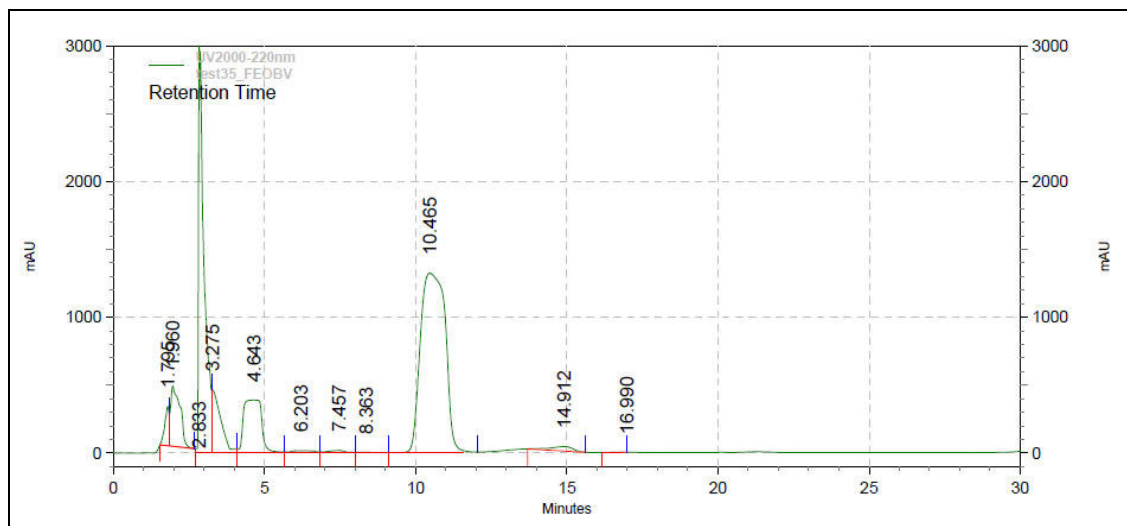
Combinaison #3

9.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (50 :20 :30), vitesse 1.5mL/min, 220nm.

Test a.

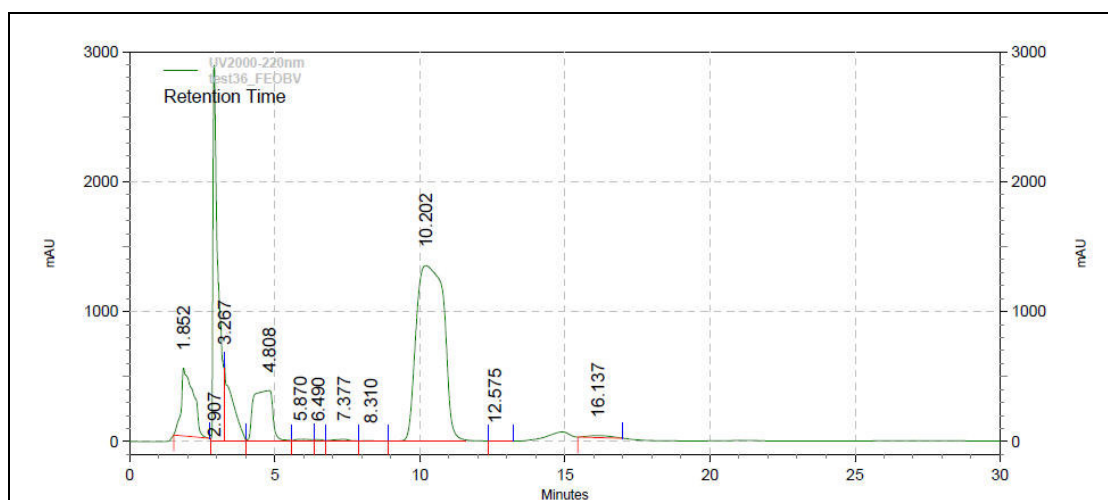
$T_R = 10.47$

ASC = 48.64%;

**Test b.**

$T_R = 10.20$

ASC = 52.15%

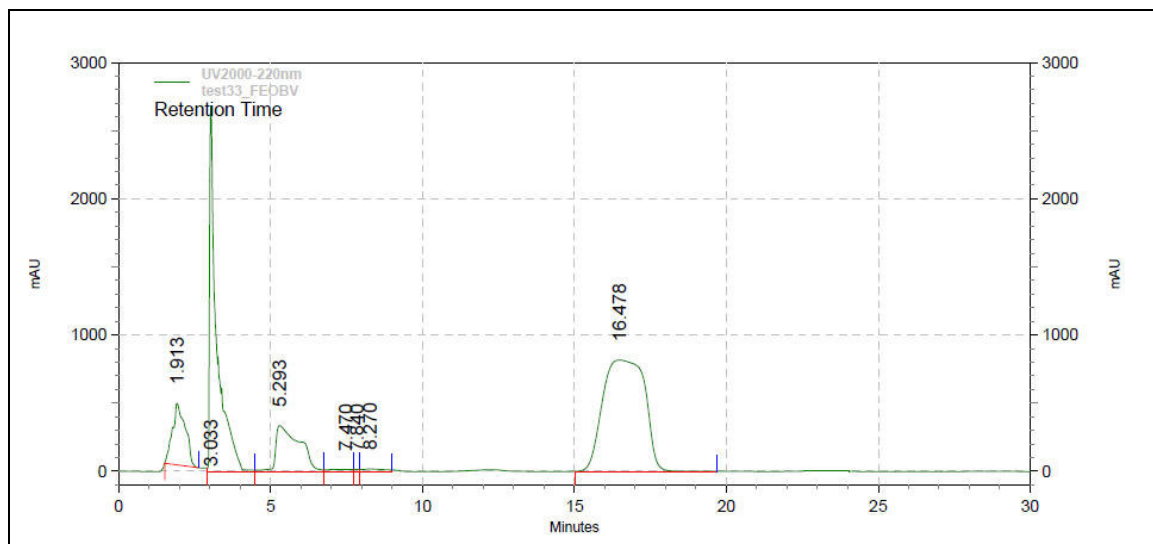


Combinaison #4

9.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (40 :24 :36), vitesse 1.5mL/min, 220nm.

T_R = 16.48

ASC = 50.30 %

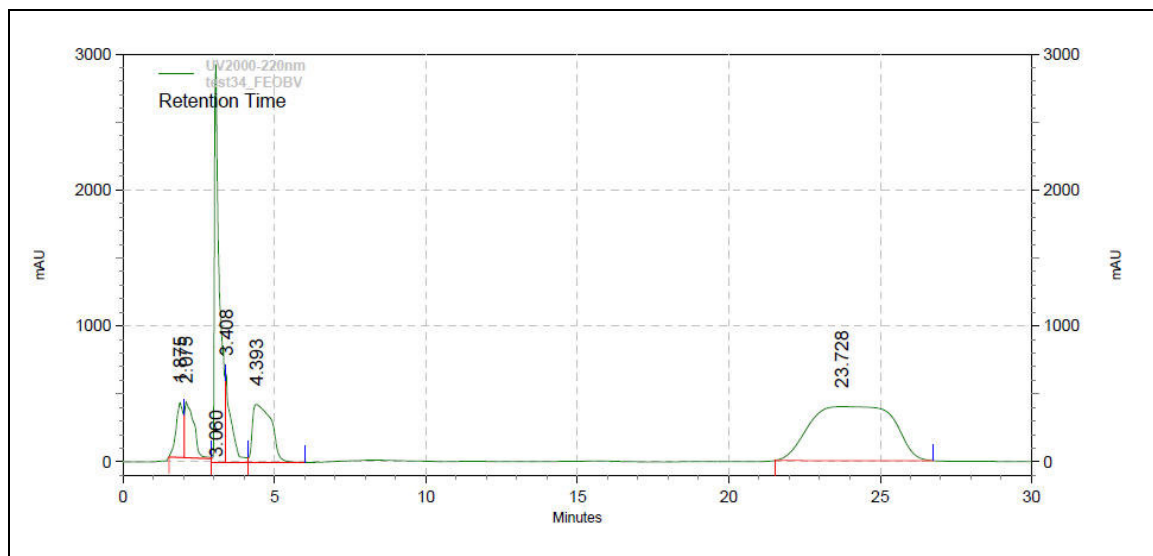


Combinaison #5

9.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (30 :28 :42), vitesse 1.5mL/min, 220nm.

$T_R = 23.73$

ASC = 50.43%

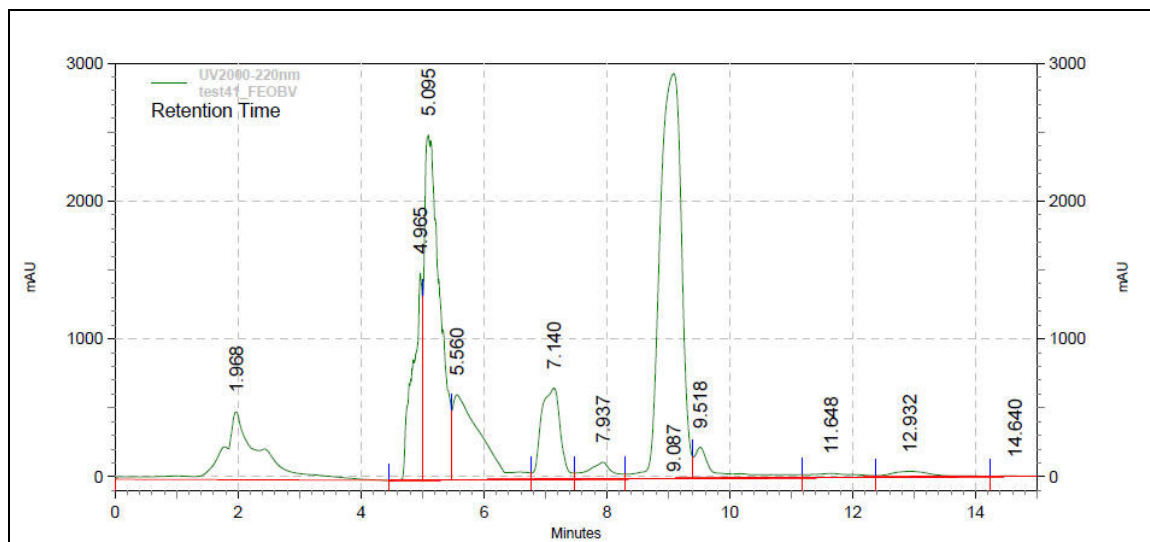


Combinaison #6

9.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (70 :12 :18), vitesse 1.5mL/min, 220nm.

T_R = 9.09

ASC = 35.95%



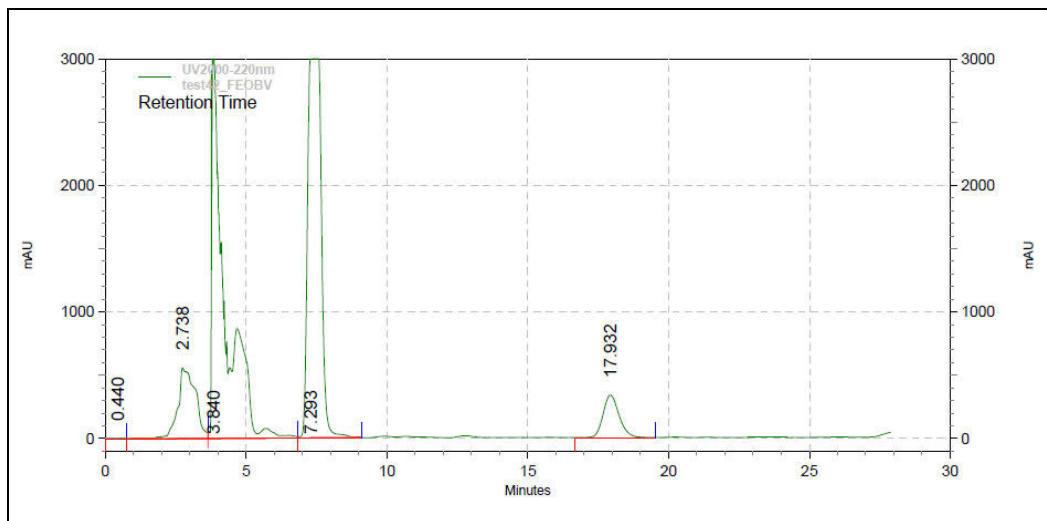
Combinaison #7

9.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (70 :12 :18), vitesse 1.0mL/min, 220nm.

Test a.

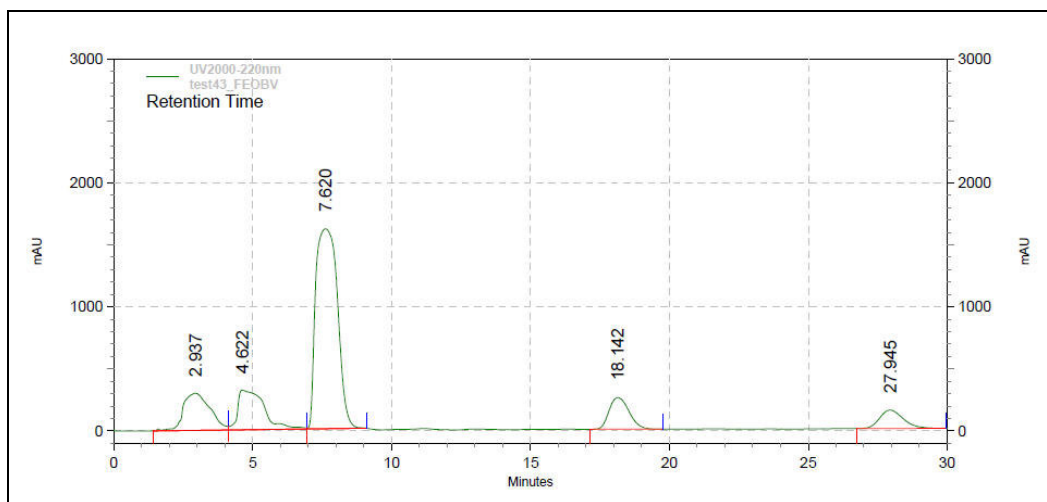
$$T_R = 7.29$$

$$ASC = 42.49\%$$

**Test b.**

$$T_R = 7.62$$

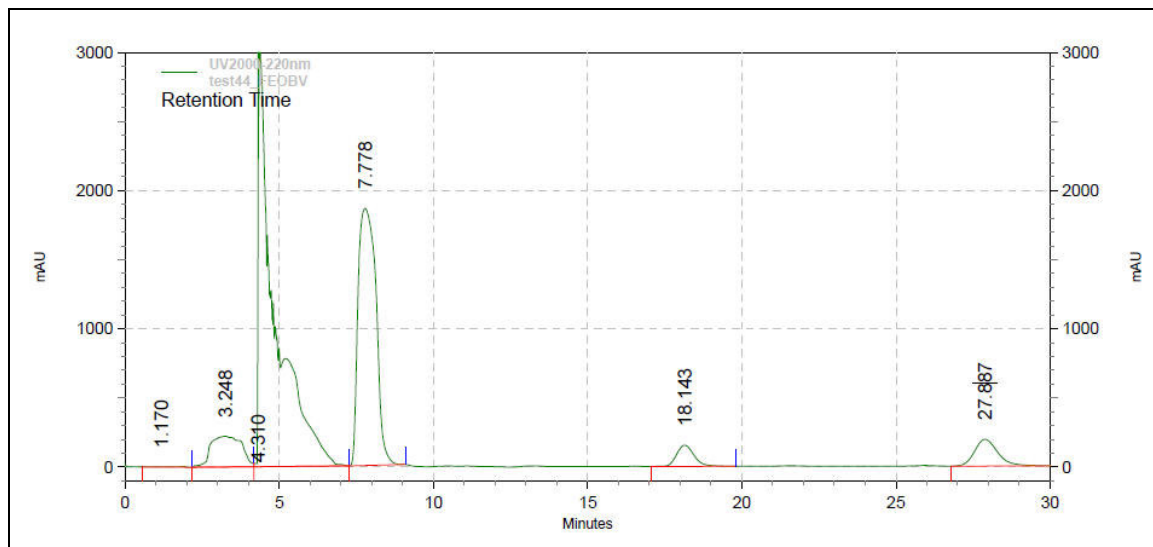
$$ASC = 58.41\%$$



Test c.

$T_R = 7.78$

ASC = 34.13%

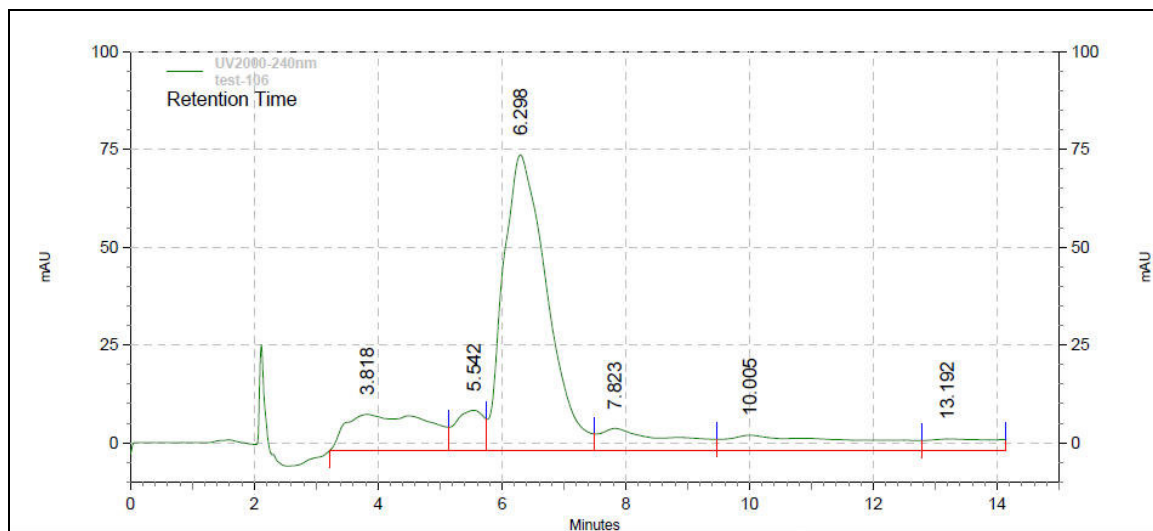


Combinaison #8

1.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (70 :10 :20), vitesse 1.0mL/min, 240nm.

T_R = 6.30

ASC = 59.99%

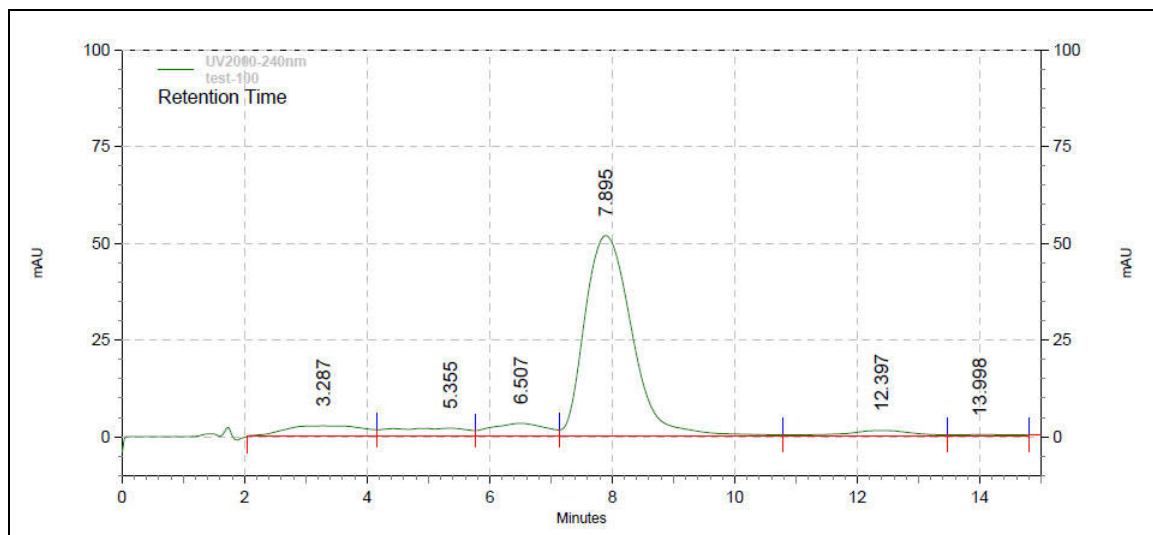


Combinaison #9

1.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (65 :20 :15), vitesse 1.0mL/min, 240nm.

T_R = 7.90

ASC = 77.17%

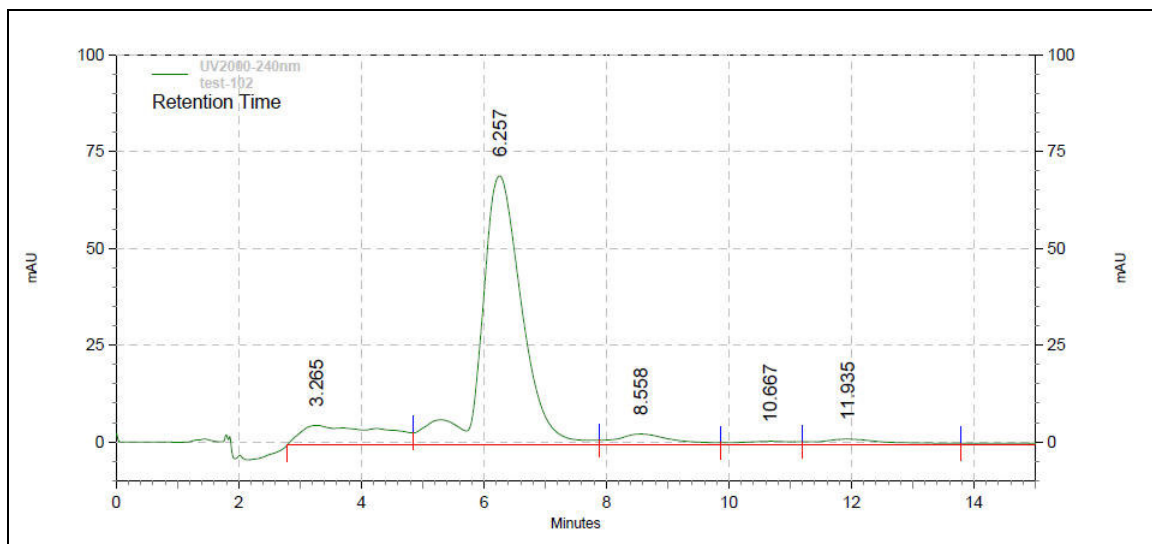


Combinaison #10

1.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (65 :15 :20), vitesse 1.0mL/min, 240nm.

T_R = 6.26

ASC = 77.11%



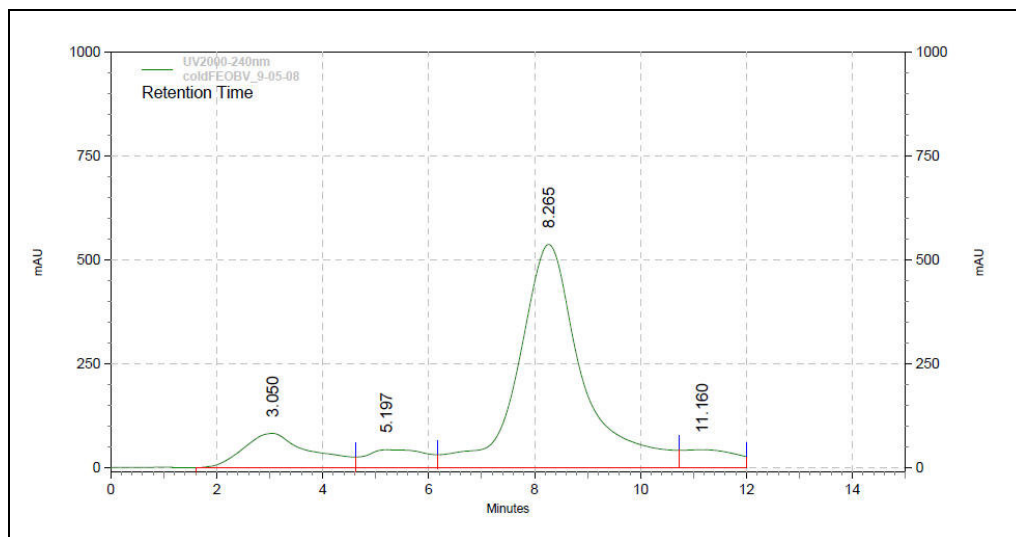
Combinaison #11

2mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (65 :15 :20), vitesse 0.75mL/min, 240nm.

Test a.

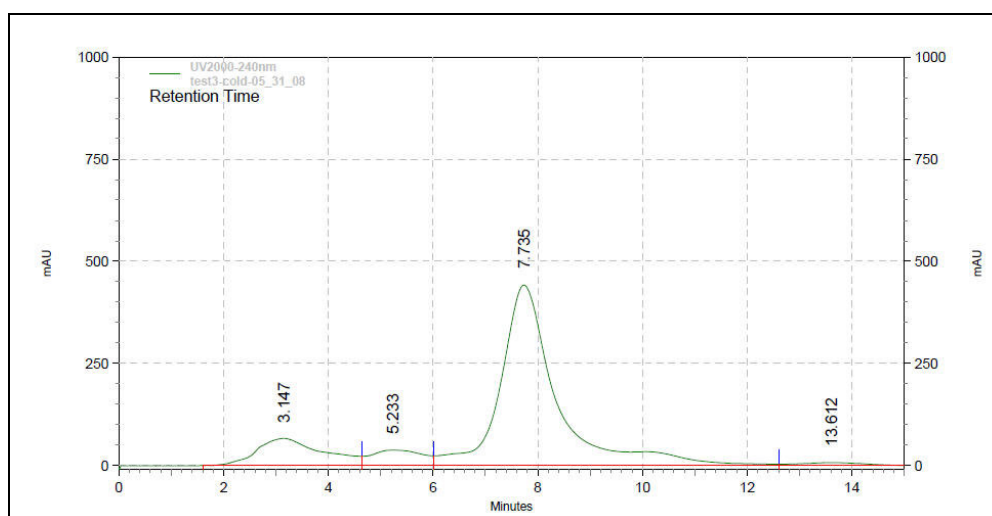
$$T_R = 8.27$$

$$ASC = 76.92\%$$

**Test b.**

$$T_R = 7.74$$

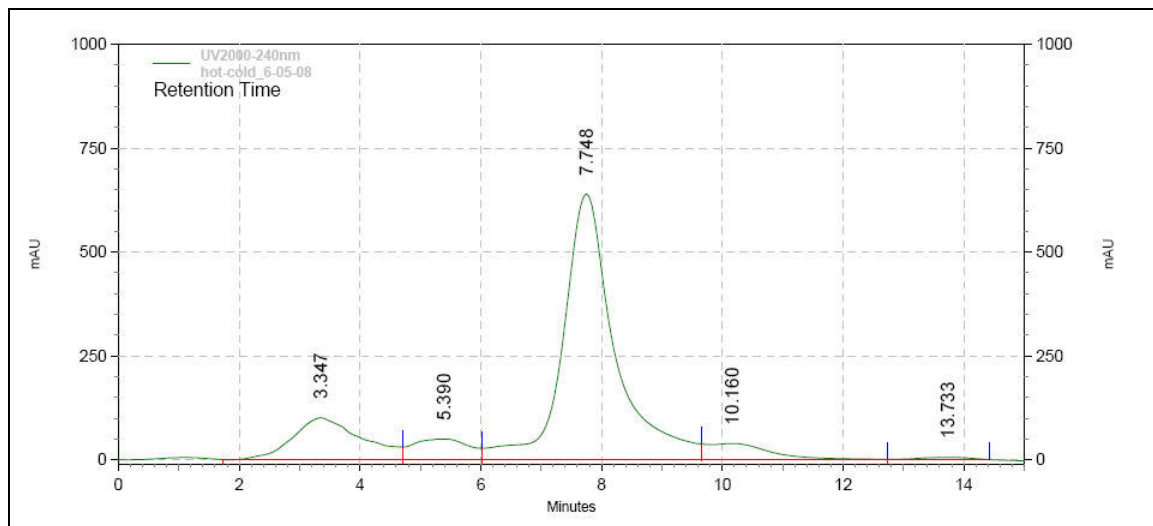
$$ASC = 78.56\%$$



Test c.

$$T_R = 7.75$$

$$ASC = 72.77\%$$



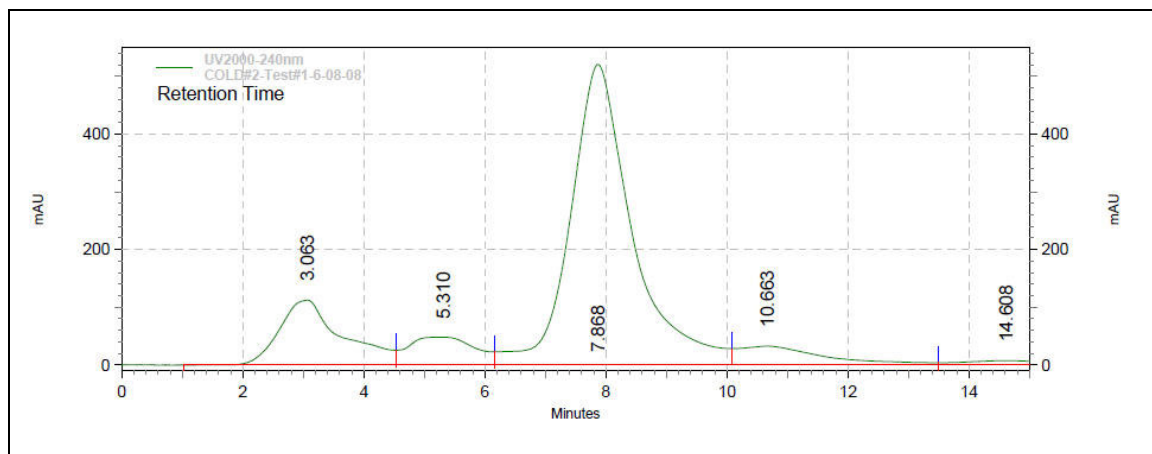
Combinaison #12

2.5mg/100mL, ACN : Na₂HPO₄:MeOH (65 :15 :20), vitesse 0.75mL/min, 240nm.

Test a.

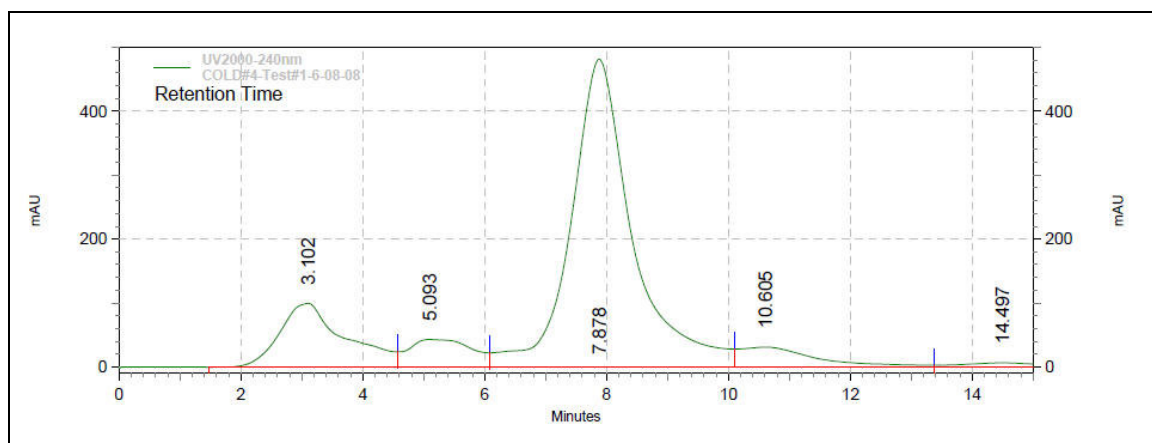
$$T_R = 7.87$$

$$ASC = 70.18\%$$

**Test b.**

$$T_R = 7.88$$

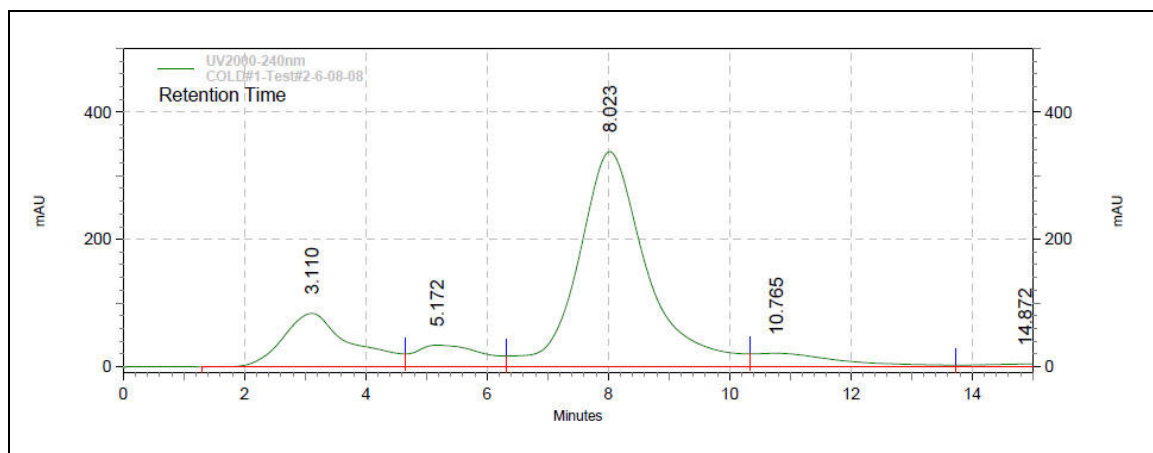
$$ASC = 70.86\%$$



Test c.

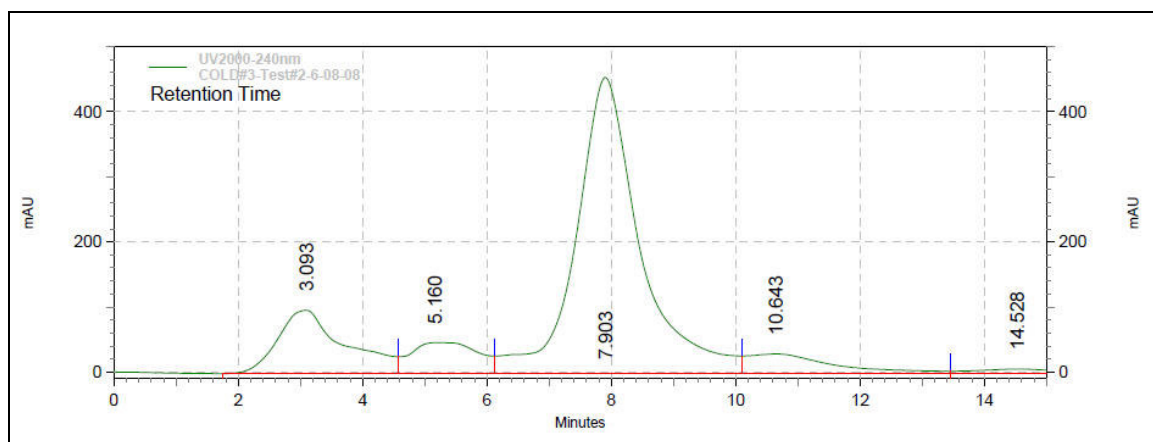
$$T_R = 8.02$$

$$ASC = 69.68\%$$

**Test d.**

$$T_R = 7.90$$

$$ASC = 69.33\%$$



Appendices

Section A. La tomographie d'émission.

La tomographie d'émission est une technique employée en médecine nucléaire, qui présente deux variantes: la tomoscintigraphie par émission monophotonique et la tomographie par émission de positons.

La Tomoscintigraphie par Émission Monophotonique (en anglais SPECT pour *Single Photon Emission Computed Tomography*) est une technique d'imagerie médicale permettant de réaliser des images en trois dimensions au moyen d'un ensemble de gamma caméras qui tournent autour du patient (pour revue, voir Zeng, GL, Galt, JR, Wernick, MN, Mintzer, RA & Aarsvold, JN., 2004). Cette technique d'imagerie nucléaire pourrait être utilisée dans les études présentées ici, mais en général à l'heure actuelle la TEP offre une meilleure résolution spatiale (voir Wernick, MN & Aarsvold, JN., 2004), et nous semble donc plus appropriée pour les études que nous projetons de réaliser (voir **Figure 13**, tirée de <http://www.jens-langner.de/ftp/MScThesis.pdf>, juin 2008.).

Comme la SPECT, la Tomographie par Émission de Positons (TEP) est une méthode d'imagerie médicale nucléaire qui permet la détermination en 3 dimensions de la répartition anatomique d'un agent radioactif administré à un sujet (Wernick, MN & Aarsvold, JN., 2004), grâce aux émissions produites par les positons issus de la désintégration de l'atome radioactif lié au traceur injecté au préalable.

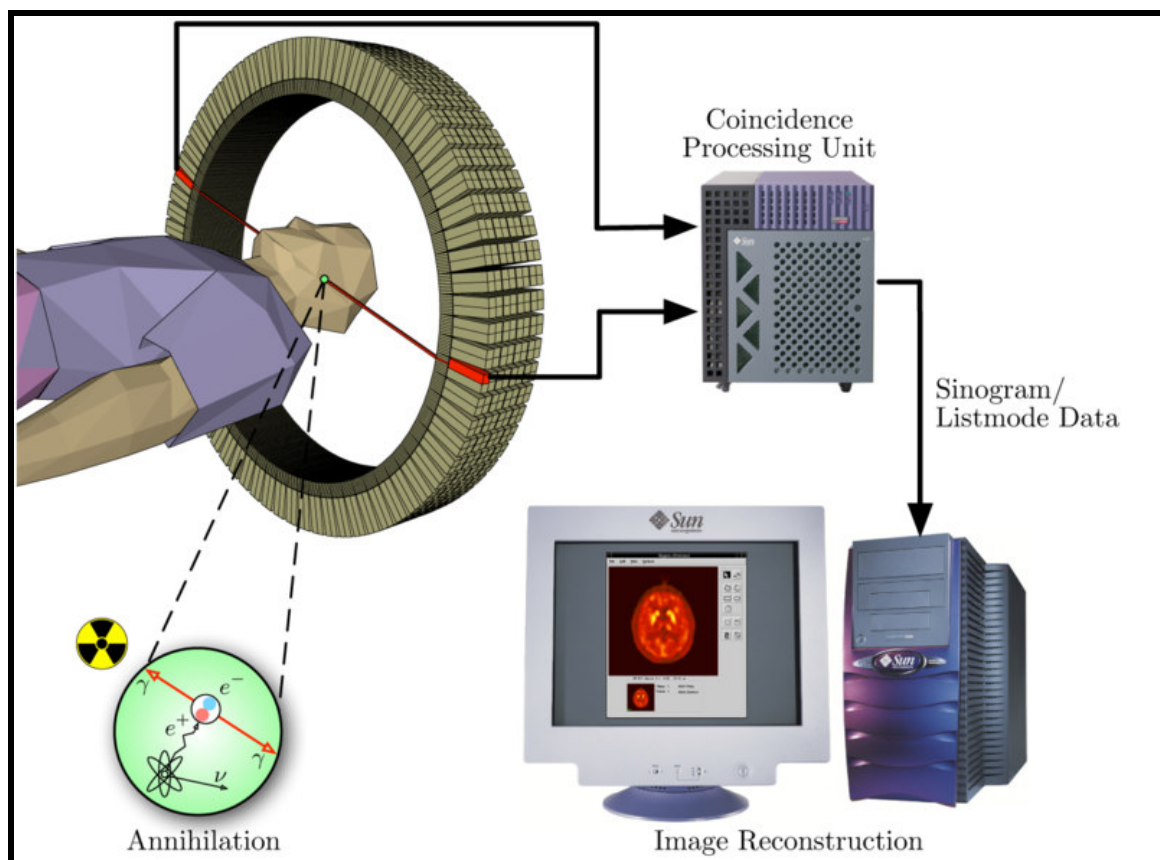


Figure 13. Illustration des principes de fonctionnement de la Tomographie par Émission de Positons (TEP).

Toujours selon les mêmes auteurs, les deux approches reposent sur le principe général qui consiste à injecter un traceur dont on connaît le comportement et les propriétés biologiques pour obtenir une image du fonctionnement d'un organe. La TEP diffère de la SPECT parce qu'elle utilise des isotopes radioactifs émetteurs de positons, alors que la SPECT utilise des isotopes radioactifs émetteurs de photons. Les atomes utilisés en TEP (carbone, fluor, azote, oxygène...) émettent donc des positons dont l'annihilation produit elle-même deux photons. La détection de la trajectoire de ces photons par la caméra TEP permet de localiser le lieu de leur émission et donc la concentration du traceur en chaque

point de l'organe. C'est cette information quantitative que l'on représente sous la forme d'une image où un code de couleurs permet de juger les concentrations locales du traceur.

Employant une gamme étendue de radiotraceurs, la TEP permet de « visualiser » par exemple la consommation de glucose des cellules, ainsi que de nombreux autres paramètres métaboliques/physiologiques, et en particulier en neurosciences plusieurs de ceux liés aux activités de neurotransmission. Par conséquent, en plus d'être une puissante technique de recherche fondamentale et clinique, elle est un outil diagnostique qui permet de déceler certaines pathologies qui se traduisent par une altération de la physiologie normale comme les cancers ou les maladies neurodégénératives.

Section B. Le métabolisme hépatique

Nous pouvons facilement concevoir que la structure chimique d'une molécule détermine son action dans le corps de l'être vivant. Selon le principe de biodisponibilité la dose administrée est également un facteur important dans la quantité de produit qui sera présente dans le sang et qui sera libre de se lier à son site spécifique afin de produire l'effet escompté.

Basé sur Meyer, JS & Quenzer, LF (2005), nous pouvons brièvement résumer les cinq facteurs qui constituent ce que l'on appelle la pharmacocinétique d'une drogue. Il y a la voie d'administration, l'absorption et la distribution, la liaison, la biotransformation et finalement, l'excrétion.

La voie d'administration indique simplement comment et où la drogue sera administrée. Cela détermine également la vitesse et la quantité de drogue qui sera absorbée dans le sang. L'absorption et la distribution sont des facteurs qui détermineront le chemin et les membranes que la drogue devra franchir avant de se rendre à son site d'action. Ensuite il y a bien sûr le facteur de liaison. Une fois que la drogue est dans le plasma sanguin, plusieurs molécules migrent vers les tissus corporels afin de se lier aux sites actifs ciblés que l'on appelle les récepteurs. Cependant, la drogue peut aussi se lier aux protéines plasmatiques ou se stocker temporairement dans les masses adipeuses du corps où elle demeure inactive. Une fois la drogue absorbée et distribuée, une certaine quantité passe par le foie où il se produit un processus de métabolisme aussi appelé biotransformation de la drogue. La quantité de drogue dans un organisme se traduit donc par une balance dynamique en-

tre l'absorption et la biotransformation de la drogue. Conséquemment, le métabolisme influence autant l'intensité que la durée des effets de la drogue. Finalement, le facteur excrétion indique que les métabolites qui ont été créés par le processus de biotransformation peuvent être éliminés par l'urine (reins) et les fèces (intestins). Il y a cependant certaines drogues qui demeurent non-métabolisées par le foie et qui sont excrétées dans leur forme inaltérée par les reins.

Comme le processus métabolique est très important dans le développement d'une molécule, nous le verrons plus en détail dans les paragraphes suivants.

Tel que mentionné par Brunton *et al.* (2005), le foie contient toutes les enzymes nécessaires pour métaboliser les drogues et l'enzyme qui est principalement impliquée dans ce processus appartient au groupe des cytochromes P450. Le processus de métabolisme est souvent divisé en deux phases de réaction biochimique. Il se peut que certaines drogues soient métabolisées en seulement une seule des deux phases, mais le plus souvent, elles seront métabolisées en deux phases et de façon séquentielle.

Le métabolisme de phase 1 implique une réduction de la drogue, aussi appelée hydrolyse, mais le processus biochimique le plus courant lors de cette phase est l'oxydation. La réaction est catalysée par les enzymes cytochrome P450 et résulte une perte d'électrons pour la drogue. Suite à la phase 1 du processus métabolique, la drogue est souvent encore active chimiquement.

Le métabolisme de phase 2 implique un processus appelé conjugaison - c'est à dire, l'ajout d'un groupe ionisé (méthyl ou acétyl) à la drogue - qui rend le métabolite plus soluble dans l'eau et qui, en réduisant son activité pharmacologique, en facilite l'excrétion.

Section C. La chromatographie

Il existe trois principaux types de chromatographie, mais nous ne parlerons ici que de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Selon Meyer (1999), la chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange. Un fluide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne. Le mélange à séparer est donc injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne, appelée phase stationnaire.

Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange, appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne.

De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les T_R des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire et la chromatographie est dite en phase normale;
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

La phase stationnaire sera donc normale ou inverse. Nous utilisons ici la phase inverse qui est majoritairement composée de silice greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}).

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile.

Finalement, un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. Les composés élués sortant de la colonne passeront à travers un détecteur UV-visible (celui que nous utilisons) qui mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. Le détecteur opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. Ainsi, au passage de chaque soluté séparé le détecteur permet l'enregistrement d'un pic.

Dans des conditions chromatographiques données, le temps de rétention (T_R , i.e. temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance.

